



Transcription par une ARN Polymerase : mesures de forces à l'échelle de la molécule unique

Philippe Thomen

► To cite this version:

Philippe Thomen. Transcription par une ARN Polymerase : mesures de forces à l'échelle de la molécule unique. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2002. Français. NNT : . tel-00011391

HAL Id: tel-00011391

<https://theses.hal.science/tel-00011391>

Submitted on 16 Jan 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Département de Physique de l'École normale supérieure



LABORATOIRE DE PHYSIQUE DE LA MATIÈRE CONDENSÉE

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

présentée par :

Philippe THOMEN

pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

sujet de la thèse :

Transcription par une ARN Polymérase : mesures de forces à l'échelle de la molécule unique

soutenue le 06 décembre 2002 devant le jury composé de :

Mme	S. Cribier	Examinatrice
MM.	H. Buc	Rapporteur
	D. Chatenay	Rapporteur
	J. Prost	Examineur
	F. Heslot	Directeur de thèse

Table des matières

Table des matières	1
Remerciements	5
1 Introduction	7
2 Mécanisme de la transcription et structure de l'ARN polymérase de T7	9
2.1 Introduction	9
2.2 Mécanisme de la transcription de l'ARN polymérase de T7	9
2.2.1 Description générale de la transcription	9
2.2.2 Enzymologie	13
2.2.3 L'initiation	18
2.2.4 L'élongation	19
2.2.5 La terminaison	20
2.3 Les analyses de séquences d'acides aminés	21
2.4 Structure tridimensionnelle de l'ARN polymérase de T7 et fonctions associées aux différents domaines	23
2.4.1 Les domaines de l'ARNPT7 partagés parmi les membres de la famille Pol I	24
2.4.2 Les domaines propres à l'ARN polymérase de T7	29
2.4.3 Sortie de l'ARN	32
2.4.4 Addenda	32
3 Description du montage	35
3.1 Principes de fonctionnement d'un piège optique	35
3.2 Description du dispositif expérimental et du matériel utilisé	37
3.2.1 Le piège et la mesure de force	37
3.2.2 Autour du piège	40
3.3 Calibration du piège	43
3.3.1 Bille dans un gel	43
3.3.2 Bille dans un liquide oscillant	44
3.3.3 Analyse du mouvement brownien d'une bille piégée	46
3.3.4 Conclusion sur les trois méthodes de calibration	49
3.4 Dépendance en z du signal	51

4	Mise en place d'une expérience	55
4.1	Description générale	55
4.1.1	Echantillon et constructions moléculaires	55
4.1.2	L'expérience	56
4.2	Mode opératoire pour la transcription	61
4.3	Une longue marche d'approche	62
5	Transcription par l'ARN polymérase de T7	65
5.1	Caractéristiques des données et méthode de traitement	65
5.1.1	Paramètres mesurés	65
5.1.2	Caractéristiques générales	68
5.1.3	Signaux non reliés à l'avancée de la polymérase	77
5.2	Résultats et analyses des expériences	85
5.2.1	Mise en évidence d'une étape liée au mouvement	86
5.2.2	Effet non Michaelien	98
5.2.3	Autres effets	107
5.3	Modèles moléculaires et théories	109
5.3.1	Concepts et définitions	109
5.3.2	Modélisation	112
5.4	Autres expériences sur des polymérases et moteurs moléculaires	126
5.5	Quelques perspectives	130
6	Mesure de friction rotationnelle de l'ADN par ouverture mécanique de la double hélice	133
6.1	Configuration moléculaire pour l'ouverture de la double hélice de l'ADN	133
6.2	Rotational drag on DNA : a single molecule experiment, Article paru dans Physical Review Letters, P. Thomen, U. Bockelmann, F. Heslot, Vol. 88 , Issue 24 (248102)	133
7	Mesure d'une interaction ADN-protéine par ouverture mécanique de l'ADN	141
7.1	Introduction	141
7.1.1	Les endonucléases de type II	141
7.1.2	L'enzyme <i>EcoR</i> V	142
7.1.3	Configuration	142
7.2	Résultats	144
7.2.1	Signal typique de force	144
7.2.2	Les séquences spécifiques	144
7.2.3	La hauteur des pics	146
7.2.4	Temps et vitesse	149
7.2.5	Quelques perspectives	149
8	Conclusions	151

9	Annexes	153
9.1	Le bactériophage T7	153
9.2	La préparation des polymérases	153
9.2.1	Préparation du fragment codant pour l'ARNPT7-biotine	154
9.2.2	Expression	155
9.2.3	Purification	155
9.3	Protocoles pour une expérience de transcription	155
9.3.1	Les différentes stratégies d'attachements spécifiques et non spécifiques . .	155
9.3.2	Polymérase biotinylée sur surface recouverte de streptavidine	156
9.3.3	Purification des complexes	158
9.4	Préparations des constructions d'ADN	165
9.5	Préparation des surfaces et des billes	167
9.6	Rappels sur la structure des protéines	167
9.7	Codes des acides aminés	169
9.8	Définitions des termes statistiques utilisés	169
	Bibliographie	171

Remerciements

Je remercie tout d'abord François Heslot. Je le remercie pour son calme et sa patience sans limite, pour sa faculté à trouver une solution aux problèmes qui ne paraissent pas en avoir une (pour moi), et pour m'avoir toujours encouragé à persévérer. Je le remercie également pour son expérience qu'il a su me faire partager, ce qui a contribué également à ma formation.

Je remercie également :

- Pascal Lopez pour son aide précieuse dans la préparation de la protéine, pour ses conseils et ses points de vue de biologiste, ainsi que pour son enthousiasme

- Henri Buc, Didier Chatenay, Sophie Cribier et Jacques Prost d'avoir accepté de faire partie du jury, et tout particulièrement H. Buc pour les échanges fructueux que nous avons eus ensemble

- Marc Dreyfus et Jean Guillerez ainsi que leurs collègues pour m'avoir accueilli et conseillé dans leur laboratoire, et pour les discussions que nous avons eues à plusieurs reprises

- Ulrich Bockelmann pour son aide et son attention notamment lors de mon stage de DEA, mon premier contact avec la recherche expérimentale

- Alexandre Dawid pour les discussions que nous avons eues ensemble, et l'intérêt qu'il a manifesté pour les expériences que j'ai menées

- Claude Delalande pour m'avoir accepté au sein du Laboratoire de Physique de la Matière Condensée

- tous les professeurs, de l'école primaire à l'université, qui m'ont donné le goût d'apprendre, et particulièrement ceux qui m'ont permis de faire de la recherche.

Enfin, je remercie Doriane, qui m'a poussé jusqu'ici, et qui m'a toujours elle aussi encouragé.

Chapitre 1

Introduction

Les moteurs moléculaires constituent une classe remarquable de la machinerie moléculaire du vivant, et permettent d'assurer des mouvements, déplacements et catalyses intracellulaires, qui sont plus rapides de plusieurs ordres de grandeur que ce que pourrait assurer une simple diffusion brownienne. Ces moteurs moléculaires consomment de l'énergie chimique, et leur mouvement résulte d'un couplage mécano-chimique dont la nature est encore mal comprise.

A la différence des systèmes actine/myosine et kinésine/tubuline qui ont été beaucoup étudiés, le fonctionnement détaillé des moteurs moléculaires associés à l'ADN sont moins bien connus. Parmi ces moteurs, les polymérases assurant la réplication et la transcription occupent une place de choix.

Nous avons choisi d'étudier un système prototype de cette classe de moteur, l'ARN polymérase du phage T7, en utilisant les techniques d'étude à l'échelle de la molécule unique. Celles-ci permettent de suivre l'évolution temporelle des nanodéplacements de l'enzyme, mais aussi -et cet aspect est central- d'imposer une force mécanique s'opposant au mouvement, et d'étudier la réponse de l'enzyme. Ce type de méthode permet donc d'étudier le couplage mécano-chimique au niveau de l'enzyme : l'application de la force permet de sonder quelles sont les étapes du cycle catalytique couplées au mouvement.

Ce manuscrit présente trois expériences différentes. La première qui constitue la partie principale de la thèse porte sur *l'étude par mesure de force de la transcription par une ARN polymérase, au niveau de la molécule unique*. Les deux autres travaux sont également des études à l'échelle de la molécule unique : *mesure de la friction de l'ADN en rotation*, et *étude de l'interaction spécifique entre une endonucléase¹ et une molécule d'ADN*.

Le choix de l'ARN polymérase du bactériophage T7 (ARNPT7) comme objet d'étude est motivé par plusieurs raisons : cette enzyme présente des homologues fortes avec la plupart des polymérases, on peut donc espérer que son mécanisme sera partagé par d'autres polymérases ; elle n'est composée que d'une seule sous-unité et son fonctionnement normal ne dépend d'aucune protéine régulatrice, ce qui permet de réduire les paramètres pour une étude *in vitro*. De plus,

¹ Protéine se fixant de façon spécifique sur des séquences cibles de l'ADN

sa vitesse importante permet de mieux en mesurer les variations.

Dans la configuration choisie, l'enzyme est fixée de façon spécifique à une surface et transcrit une molécule d'ADN dont une extrémité est attachée à une microbille, elle-même maintenue dans un piège optique. Pendant la translocation l'enzyme exerce une force sur la bille qui peut être détectée.

Un des objectifs est de chercher à caractériser le mode d'avancée de l'enzyme en étudiant comment la force de charge modifie la vitesse de la polymérase.

Les deux autres études font suite aux expériences d'ouverture mécanique de l'ADN menées au laboratoire depuis quelques années. La configuration utilisée consiste à tirer sur les extrémités des brins de l'ADN de façon à les séparer à la manière d'une fermeture éclair.

La mesure de la friction en rotation s'inscrit dans l'étude de la dynamique d'ouverture et fermeture de l'ADN : lors de l'ouverture, l'ADN tourne à cause de la structure en double hélice ; si l'ouverture est réalisée très rapidement, les effets de friction en rotation deviennent mesurables. Les phénomènes de friction de rotation de l'ADN étant supposés jouer un rôle éventuel dans certains mécanismes biologiques, cette mesure indirecte constitue une information intéressante.

La configuration utilisée pour ouvrir l'ADN est particulièrement adaptée pour l'étude des interactions entre ADN et protéine : elle permet en effet de "forcer" la dissociation d'une enzyme fixée sur l'ADN. La méthode est originale et peut fournir des informations concernant la reconnaissance de la séquence spécifique de l'enzyme et l'interaction entre l'enzyme et cette séquence. L'enzyme *EcoR V* est un modèle intéressant comme on le justifiera dans le chapitre consacré à cette expérience.

Le chapitre 2 qui suit est consacré au mécanisme de la transcription, et à la structure cristallographique de l'ARN polymérase du bactériophage T7. Les chapitres 3 consacré à la description du montage, et 4 consacré aux aspects pratiques de la mise en place d'une expérience, sont communs aux trois travaux. Le chapitre 5 rassemble les résultats expérimentaux obtenus concernant la transcription, ainsi que leur traitement. La mesure de friction sur l'ADN et l'étude de l'interaction ADN-*EcoR V* sont respectivement présentés dans les chapitres 6 et 7. Le lecteur trouvera en annexe les détails des préparations et des protocoles, ainsi que certains rappels sur la structure des protéines.

Chapitre 2

Mécanisme de la transcription et structure de l'ARN polymérase de T7

2.1 Introduction

L'objet de ce chapitre est tout d'abord de rappeler les étapes clés du processus de transcription en général puis plus spécifiquement pour l'ARN polymérase du bactériophage T7 (ARNPT7) (cf. annexe 9.1 pour des notes concernant le phage T7). Après avoir décrit la synthèse des acides nucléiques, on rappellera succinctement les connaissances actuelles sur le mécanisme de la transcription chez l'ARNPT7. Les résultats des études concernant la structure de la protéine, ou des comparaisons de séquences de différentes polymérases seront également présentés. Enfin une description de la structure tridimensionnelle de l'ARNPT7 illustrera les différentes fonctions que remplit l'enzyme (la lecture de cette description n'est pas indispensable pour la compréhension de la suite).

2.2 Mécanisme de la transcription de l'ARN polymérase de T7

2.2.1 Description générale de la transcription

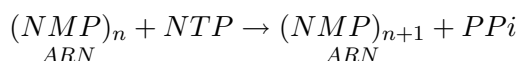
L'acide désoxyribonucléique (ADN) est la molécule qui contient l'information génétique de chaque être vivant. Elle est constituée de deux brins appariés, enroulés en double hélice. Chaque brin résulte d'un assemblage linéaire d'unités élémentaires dénommées nucléotides (cf. figures 2.1 et 2.2). Chaque nucléotide porte une base azotée : l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) ou la guanine (G). C'est la séquence de nucléotides qui définit l'information génétique. Une partie de l'information (les gènes) est utilisée notamment pour la synthèse des protéines : on parle de l'expression d'un gène. Un gène est tout d'abord copié sous la forme d'un acide nucléique simple brin, l'acide ribonucléique (ARN) : c'est l'étape de transcription, catalysée par une polymérase. La copie sous forme d'ARN subit éventuellement des transformations (épissage, édition, modifications, transport...) puis est traduite par les ribosomes qui assemblent les acides aminés pour former la protéine : c'est l'étape de traduction. L'ARN codant pour la synthèse des

protéines est appelé ARN messenger (ARNm); les polymérases synthétisent d'autres ARN : les ARN ribosomiaux, les ARN de transfert (ARNt) ou certains ARN catalytiques.

Une polymérase désigne plus généralement une protéine qui catalyse l'assemblage de nucléotides tout en se déplaçant sur un substrat. Le substrat peut être l'ADN ou l'ARN; le produit de la réaction est lui aussi un ADN ou un ARN. Dans le cas particulier de la transcription, le substrat est l'ADN et le produit l'ARN : on parle d'ARN polymérase (ARNP) ADN-dépendante. Les ADN polymérases (ADNP) ADN-dépendantes sont impliquées dans le mécanisme de réplication de l'ADN : lors de la division cellulaire, l'information génétique est dupliquée. Les ADNP ARN-dépendantes sont aussi appelées transcriptase inverse (RT¹) : ce sont souvent des polymérases virales (comme la RT du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)) chez qui l'information est stockée sous forme d'ARN puis est utilisée une fois transcrite en ADN.

La transcription se déroule en trois étapes : (i) l'initiation consiste en la reconnaissance, par la polymérase, d'une séquence spécifique appelée promoteur, sur laquelle elle se fixe ; le promoteur marque en quelque sorte le début d'un gène ; (ii) l'élongation, dont on décrit schématiquement le principe sur la figure 2.3 est la phase durant laquelle la polymérase copie l'information génétique sous forme d'ARN ; (iii) la terminaison marque la fin de la transcription : une séquence spécifique arrête la polymérase qui se dissocie de l'ADN et de l'ARN. De façon générale pour les ARNP, de nombreuses protéines interviennent au cours de ces trois étapes pour agir sur la transcription ; elles sont importantes pour la régulation de l'expression des gènes. L'ARNPT7, polymérase de phage, a la particularité de fonctionner sans ces *facteurs transcriptionnels*².

Quelque soit le substrat et le produit, une polymérase catalyse la synthèse d'un acide nucléique. En assemblant chaque partie élémentaire de cet acide nucléique elle consomme de l'énergie. A chaque incorporation d'un nucléotide a lieu une réaction d'hydrolyse qui libère de l'énergie. Le nucléotide est incorporé à la chaîne d'ARN, et la réaction peut être décrite de la manière suivante :



Le nucléotide est dégradé et le résidu $H_4P_2O_7$ est appelé pyrophosphate (PPi). La variation d'énergie libre lors de cette réaction peut s'écrire sous la forme :

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[PPi]}{[NTP]}$$

Le terme ΔG^0 est déterminé dans des conditions standards (1M [PPi] et 1M [NTP]). Il vaut ~ -2 kcal/mol [5]. Les PPi et les NTP déplacent l'équilibre de la réaction : la présence de PPi favorise la pyrophosphorylation, *i.e.* la dépolymérisation de la chaîne d'ARN, celle des NTP favorise la polymérisation. Dans les conditions des expériences présentées (cf. pages 85 et 100) la concentration en NTP est très largement supérieure à celle des PPi (1000 fois environ), et la variation totale d'énergie libre est comprise entre -6 et -7 kcal/mol, ce qui représente un gain de 10 à 12 kT à chaque incorporation.

¹On note par la suite RT pour transcriptase inverse ("reverse transcriptase")

²mis à part le Lysosyme de T7 que l'on évoque par la suite.

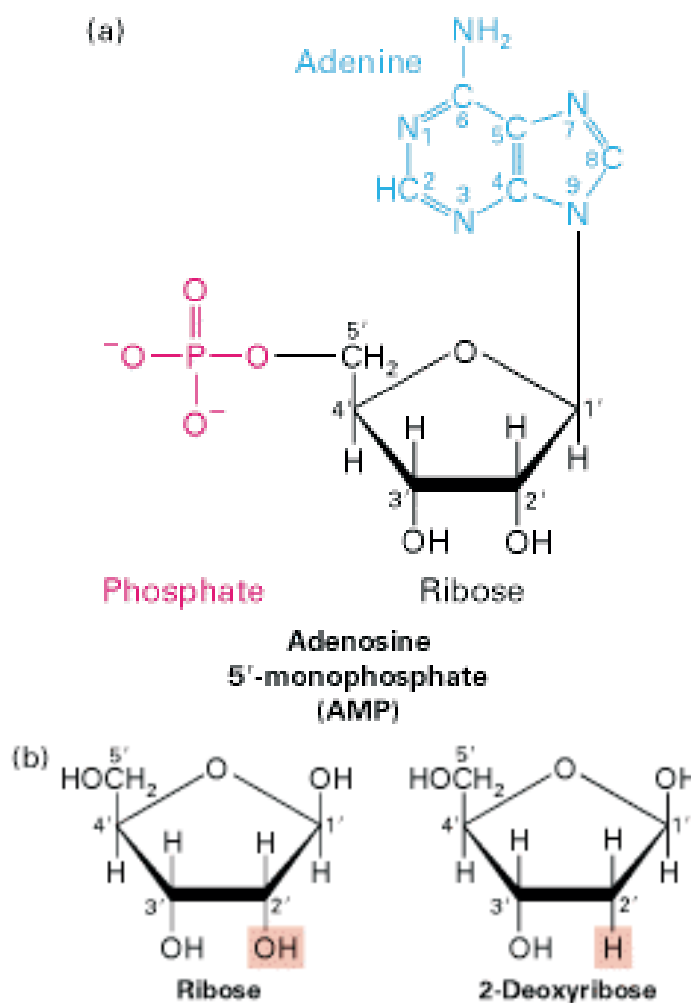


FIG. 2.1 – Un nucléotide est composé d'une base, d'un sucre et d'une partie tri-, di-, ou monophosphate. (a) : représentation de l'adénosine monophosphate (AMP), nucléotide monophosphate dont la base est l'adénine. (b) : une différence entre les ribonucléotides (NTP) formant l'ARN et les désoxyribonucléotides (dNTP) formant l'ADN ; les NTP portent un ribose, avec un groupement OH sur le carbone 2' (à gauche), les dNTP portent un désoxyribose où le groupe OH n'est pas présent. La thymine de l'ADN est remplacée par l'uracile chez l'ARN : ce sont les seules différences entre la composition chimique de l'ADN et celle de l'ARN.

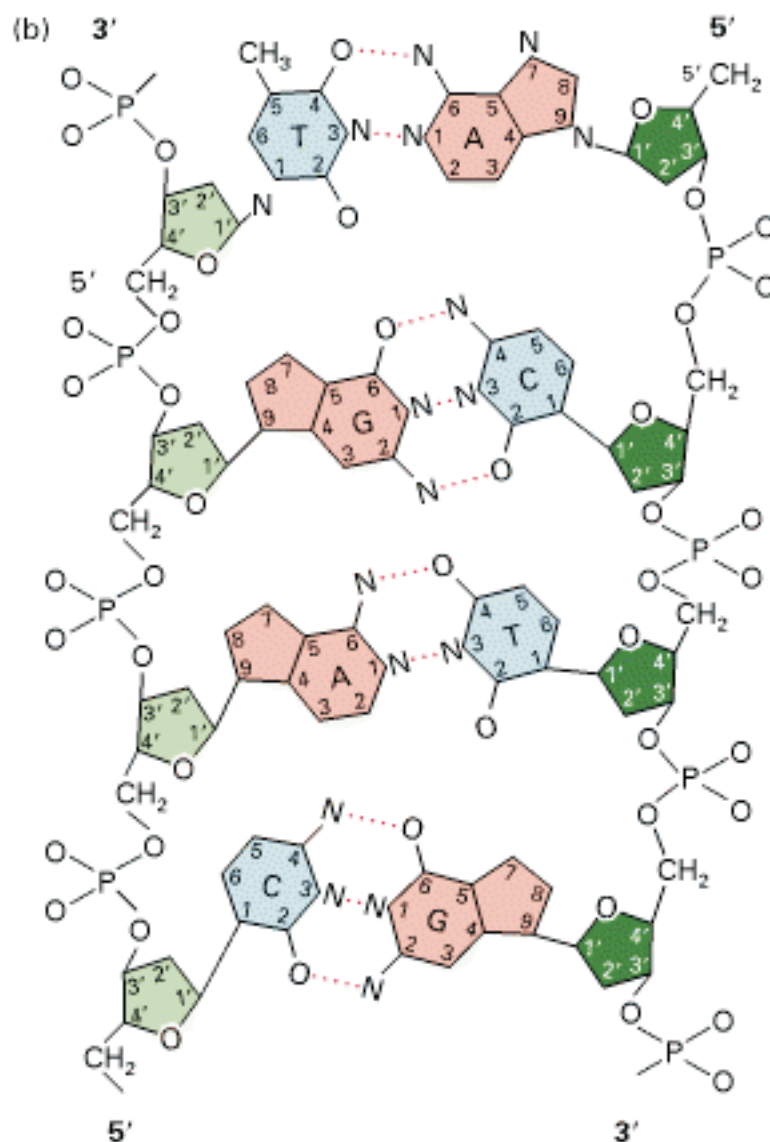


FIG. 2.2 – Schématisation de l'hybridation de deux brins d'ADN. Les brins sont orientés ; on repère le sens par le carbone se trouvant à l'extrémité du brin (3' ou 5'). Les nucléotides de chaque brin sont assemblés par une liaison phosphodiester. Les brins sont appariés par les bases : A avec T et C avec G. Ces liaisons sont faibles (de l'ordre de kT) comparées aux liaisons covalentes joignant les nucléotides de chaque brin. Plus spécifiquement, les liaisons CG sont plus fortes que les liaisons AT (3 liaisons hydrogènes pour CG contre deux pour AT). Sans contrainte extérieure, l'ADN double brin adopte une conformation en hélice (qui n'est pas symbolisée sur la figure) appelée ADN-B dont les caractéristiques sont : rayon moyen de 2 nm, 10.5 bases par tour, 3 bases par nanomètre.

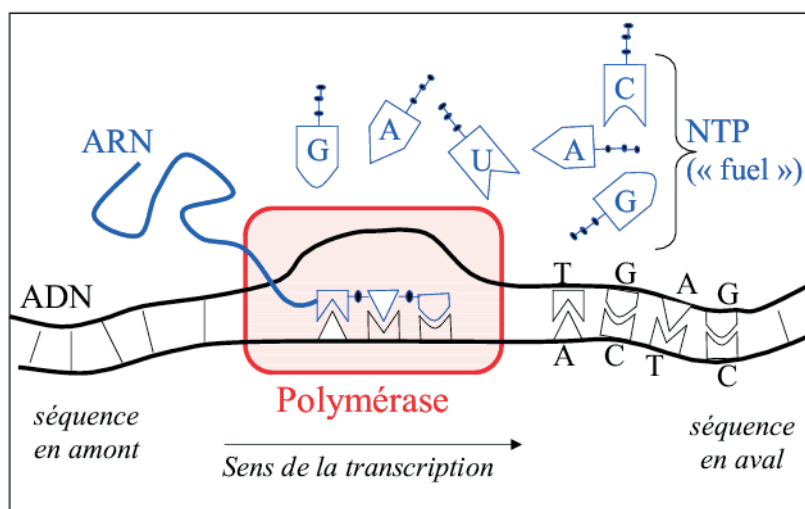


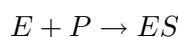
FIG. 2.3 – Schématisation du processus de transcription. La polymérase avance sur l'ADN à la manière d'un train sur des rails. A chaque pas, la polymérase incorpore un nucléotide provenant de la solution dans la chaîne d'ARN qu'elle synthétise. Pour cela, elle ouvre partiellement la double hélice d'ADN (formation de la bulle de transcription); l'ordre d'incorporation est basé sur l'appariement des paires de bases : les nucléotides incorporés sont complémentaires du brin d'ADN copié (brin du bas sur le schéma). Lors de l'incorporation, la partie triphosphate de NTP (schématisée par trois points) est clivée dans une réaction chimique dégageant de l'énergie (voir texte) et libérant du pyrophosphate (PPi).

2.2.2 Enzymologie

Le type de réaction, dans laquelle on distingue deux étapes principales : fixation d'un substrat par une seule entrée puis catalyse, est décrit par le schéma réactionnel suivant :



où E représente l'enzyme, S le substrat et P le produit de la réaction. Dans le cas de la transcription, E désigne l'enzyme complexée à l'ADN et à l'ARN naissant³; S et P désignent respectivement : le NTP et le pyrophosphate. k_{-1} et k_{cat} sont des constantes dites du premier ordre (en s^{-1}) et k_1 est une constante du second ordre (en $s^{-1}M^{-1}$). La seconde étape, indépendante de la concentration en substrat, constitue la catalyse de la réaction. Si la réaction a atteint l'état stationnaire (les concentrations $[E]$, $[S]$ et $[ES]$ n'évoluent plus en fonction du temps) et que la réaction inverse :



n'est pas permise, dans la mesure où la concentration $[P]$ est considérée comme quasi nulle,

³On suppose implicitement que la réaction est infiniment processive, i.e. que la dissociation du complexe ADN/polymérase est négligeable.

la vitesse de réaction est donnée par $V = k_{cat} \cdot [ES]$; la vitesse maximale V_M est obtenue quand toutes les enzymes présentes réagissent : $V_M = k_{cat} \cdot [E]_{tot}$, avec $[E]_{tot} = [E] + [ES]$.

Dans ce cas, la vitesse de réaction (i.e. la vitesse d'un cycle d'incorporation d'un NTP) est donnée par l'équation de Michaelis-Menten :

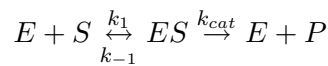
$$V = d \cdot E_{tot} \frac{k_{cat}}{1 + \frac{k_{cat} + k_{-1}}{k_1}} = \frac{V_M}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (2.2.1)$$

où d est le pas de l'enzyme, E_{tot} la concentration totale d'enzyme, V_M est la vitesse maximale de réaction, correspondant à la limite de V quand $[S]$ tend vers l'infini, et K_m est la constante de Michaelis qui vérifie : $V(K_m) = V_M/2$. Le K_m est relié à l'affinité du substrat pour le site actif de l'enzyme. Notamment, si $k_{cat} \ll k_{-1}$, i.e. si l'étape de catalyse est lente devant la dissociation enzyme-substrat, $K_m \approx k_{-1}/k_1 = K_D$, i.e. la constante de dissociation du complexe ES.⁴

L'équation de Michaelis-Menten est obtenue par un raisonnement sur la réaction d'un ensemble d'enzyme et de substrat. On peut aboutir au même résultat par un autre raisonnement, (développé par Ninio [76]) en considérant une seule enzyme. C'est une approche plus intuitive du fonctionnement de l'enzyme. Les hypothèses sont les suivantes [77] :

1. le processus est probabiliste
2. les réarrangements dus aux changements d'état ont une durée négligeable. Une constante k du premier ordre décrit la fréquence de transition (i.e. la probabilité de transition par unité de temps)
3. lors d'une transition dont la constante de réaction associée est k , la probabilité de transition pendant l'intervalle de temps dt est $k \cdot dt$.

Dans le cas d'une réaction à une entrée, dans laquelle la catalyse est irréversible :



k_1 correspond à la fréquence d'association par unité de concentration de substrat. Si on définit t_a comme le temps moyen d'attente de l'enzyme avant que le substrat n'arrive, on a simplement : $t_a = 1/(k_1[S])$. On désigne ensuite par t_r le temps moyen que l'enzyme passe avec son substrat (i.e. dans l'état ES) avant d'être de nouveau libre, et par p la probabilité que la réaction de catalyse ait lieu ($1-p$ est alors la probabilité que le complexe ES se dissocie). Le temps moyen d'un cycle association-dissociation (avec une probabilité p d'aboutir au produit) est donc la somme $t_a + t_r$. Soit θ le temps moyen pris par l'enzyme pour transformer le substrat (association + catalyse) ; s'il n'y a pas de dissociation, le temps total est $t_a + t_r$, s'il y a dissociation, le temps total est $t_a + t_r + \theta$; en pondérant chacun des termes par leur probabilité, on tire :

$$\theta = p(t_a + t_r) + (1 - p)(t_a + t_r + \theta)$$

Soit :

⁴On trouve parfois les notations k_b ou K_A pour la constante d'association ; par définition : $k_b = K_A = K_D^{-1}$.

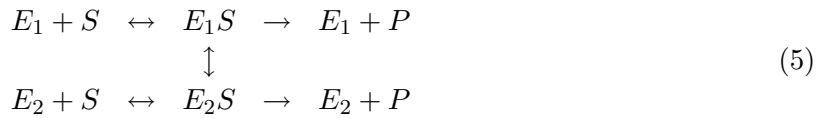
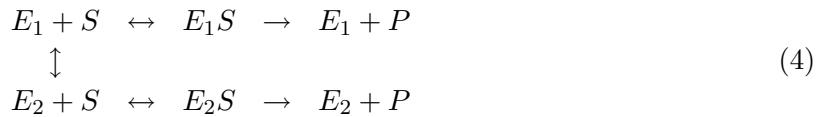
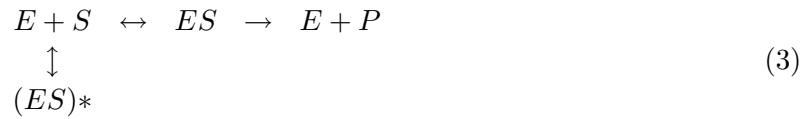
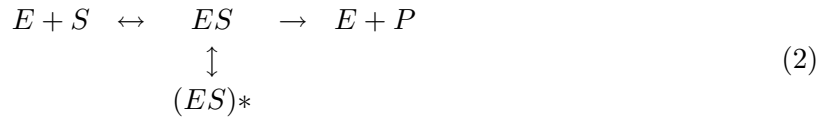
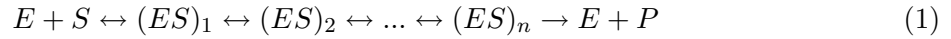
$$\theta = \frac{t_a + t_r}{p}$$

En notant que la vitesse moyenne de l'enzyme est donnée par $1/\theta$, on établit :

$$V = \frac{p/t_r}{1 + 1/(k_1 t_r [S])}$$

Avec $p = t_r \cdot k_{cat}$, $(1 - p) = t_r \cdot k_{-1}$, conformément à la troisième hypothèse. On identifie les constantes V_M et K_m : $V_M = p/t_r$, $K_m = 1/k_1 t_r$.

De nombreux schémas conduisent à une cinétique Michaelienne. Quelques uns sont énumérés ci-dessous :



On peut par exemple ajouter autant d'étapes que l'on veut entre la formation du complexe ES et la catalyse (schéma (1)). Si on ajoute un embranchement sur une des étapes (schémas réactionnels (2) et (3)), le V_M et le K_m sont modifiés, mais la cinétique reste Michaelienne. Dans le cas de la transcription, la présence de trois espèces de "mauvais" nucléotides à chaque incorporation n'affecte pas la cinétique : elle reste Michaelienne [76]. La réaction peut être décrite par le schéma (3) où l'entrée d'un mauvais NTP fait passer l'enzyme vers l'état $(ES)^*$ incompetent. De même les schémas 4 et 5 mènent à une cinétique Michaelienne.

Pour vérifier si la cinétique de la réaction est Michaelienne, il est plus simple de représenter l'inverse de la vitesse en fonction de l'inverse de la concentration en substrat ; dans cette représentation, dite de Lineweaver-Burke, on doit obtenir une droite (voir figure 2.4) si la réaction suit la loi de Michaelis-Menten :

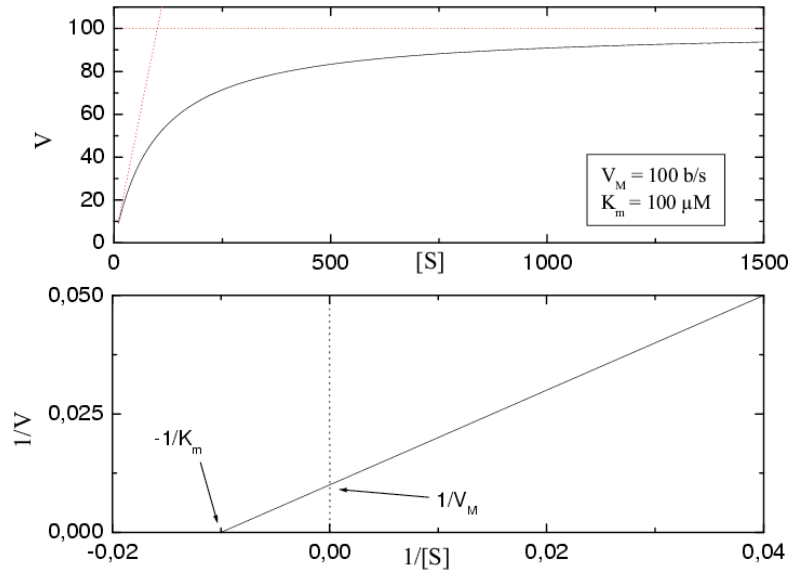
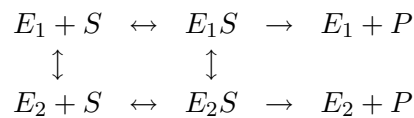


FIG. 2.4 – Relation entre la vitesse de réaction V et la concentration en substrat $[S]$ (en haut), et entre $1/V$ et $1/[S]$ (en bas) dans un processus du type Michaelis-Menten (cf. équation 2.2.1). Dans cette représentation (dite de Lineweaver-Burke), l'intersection de la droite avec l'axe vertical est $1/V_M$, la droite coupe l'axe des abscisses en $-1/K_m$, et la pente de la droite correspond au rapport K_m/V_M .

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_M} + \frac{K_m}{V_M} \cdot \frac{1}{[S]} \quad \text{d'après l'équation 2.2.1}$$

$1/V$ a la dimension d'un temps, et est la somme de deux termes, dont un dépend de la concentration en substrat $[S]$. Dans le cas de la transcription, $1/V$ représente le temps que met la polymérase pour incorporer un nucléotide dans la chaîne d'ARN (le temps du cycle d'incorporation), et $1/[S]$ est relié à la durée entre deux collisions entre un NTP et la polymérase. Le temps indépendant de la concentration en nucléotide ($1/V_M$) se rapporte à l'étape de catalyse, et le temps proportionnel à $1/[S]$ ($K_m/V_M[S]$) se rapporte à la fixation du nucléotide dans le site actif.

Dans les exemples précédents, le schéma réactionnel est linéaire (1), ou bien il n'y a qu'un embranchement à chaque fois (2 à 5). S'il existe deux interconnexions, comme dans le schéma suivant :



on peut montrer que la cinétique change. Au lieu de faire intervenir deux constantes comme dans les cas 1 à 5, elle en fait intervenir 4; et la vitesse s'exprime sous la forme générale [76] :

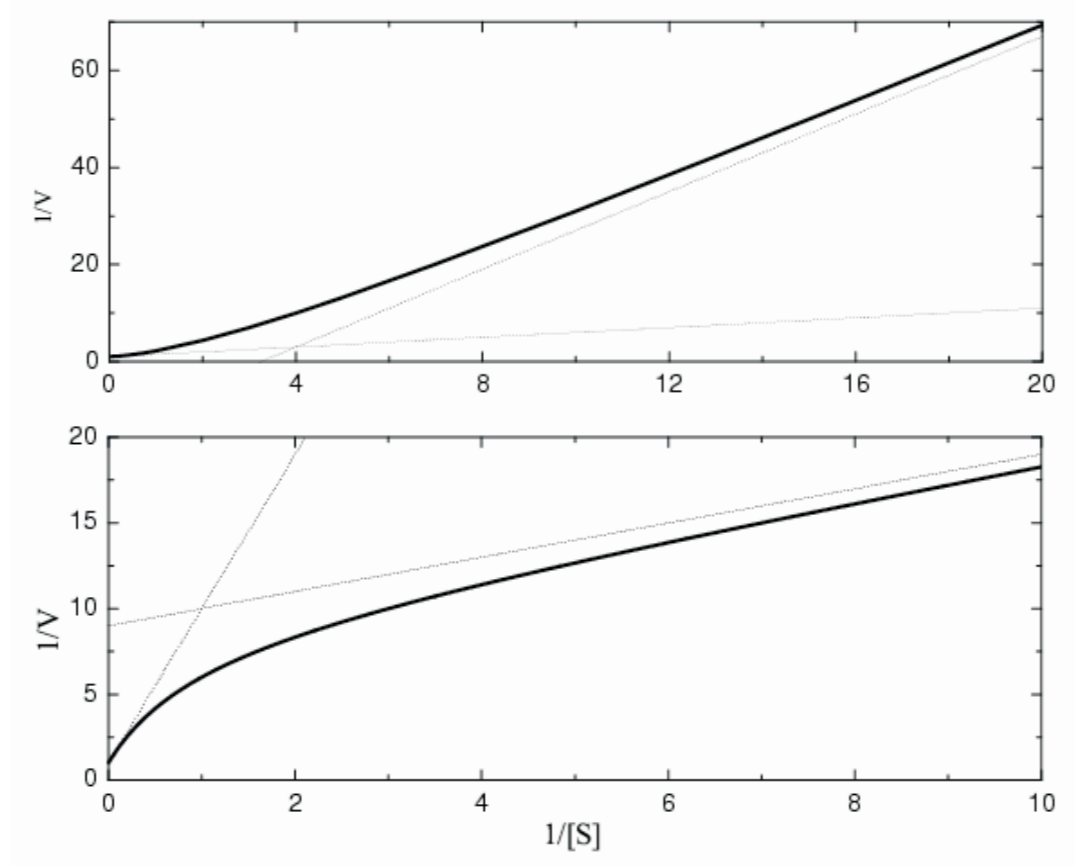


FIG. 2.5 – Relation entre l'inverse de la vitesse et l'inverse de la concentration en substrat dans un mécanisme non-Michaelien décrit par l'équation 2.2.2. La courbes possèdent deux asymptotes. Deux cas sont possibles suivant la valeur des coefficients : la dérivée de $1/V$ croît avec $1/[S]$ (figure du haut) ou elle décroît quand $1/[S]$ augmente (figure du bas). Ici, les valeurs choisies sont : $a=0.25$ $b=1$ $c=0.75$ $d=1$ pour la courbe du haut, $a=b=d=1$ et $c=10$ pour celle du bas.

$$V = \frac{aS + bS^2}{1 + cS + dS^2} \quad (2.2.2)$$

Pour un tel mécanisme, la courbe $1/V$ en fonction de $1/[S]$ n'est plus une droite, mais a la forme d'une sigmoïde⁵ donnée sur la figure 2.5. Les quatre constantes a , b , c et d de l'équation 2.2.2 définissent deux équations de droite qui représentent les asymptotes de la courbe :

⁵Une cinétique non-Michaelienne peut signer l'effet d'une allostérie. Les enzymes allostériques sont généralement composées de plusieurs sous-unités identiques associées (des protomères) qui existent sous au moins deux conformations différentes. Les protomères interagissent avec des métabolites régulateurs appelés "modulateurs" ou "effecteurs". Ces derniers se fixent de façon non covalente sur la protéine ; le taux d'occupation des sites de fixation sur les protomères détermine la conformation de l'enzyme. Ce principe a été énoncé pour la première fois par Monod et al. [12] pour expliquer la cinétique de fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine. Le schéma réactionnel peut être compliqué suivant le nombre de sites disponibles pour les effecteurs, et la cinétique n'est pas forcément décrite par l'équation 2.2.2, mais la courbe garde la forme d'une sigmoïde.

$$\frac{1}{V} = \frac{d}{b} + \left(\frac{c}{b} - \frac{da}{b^2}\right) \cdot \frac{1}{[S]} \quad \text{pour } [S] \rightarrow \infty$$

$$\frac{1}{V} = \left(\frac{c}{a} - \frac{b}{a^2}\right) + \frac{1}{a} \cdot \frac{1}{[S]} \quad \text{pour } [S] \rightarrow 0$$

Deux cas de figure sont possibles suivant les pentes des asymptotes : la dérivée de $1/V$ croît avec $1/[S]$ ou bien elle décroît avec $1/[S]$.

Un tel comportement a été observé par Foster et al. [75] sur l'ARNP d'*E. coli*, avec une pente de $1/V$ qui croît en fonction de $1/[S]$.

On décrit maintenant plus en détail les trois étapes de la transcription : initiation, élongation et terminaison, chez l'ARNPT7.

2.2.3 L'initiation

L'initiation consiste tout d'abord en la reconnaissance par la polymérase d'une séquence promoteur sur l'ADN à transcrire. La séquence dite consensuelle du promoteur de l'ARNPT7 contient 23 bases, notées de -17 à +6, +1 correspondant à la première base transcrite :

brin non codant :



On peut diviser cette séquence en trois parties. La première partie de -17 à -6 constitue la séquence de reconnaissance spécifique. Une mutation ponctuelle dans cette séquence d'ADN diminue l'affinité de la polymérase pour le promoteur.

La seconde partie, de -4 à -1 est composée de la séquence TATA, importante pour la séparation des deux brins d'ADN au niveau du promoteur, et commune à de nombreuses séquences promoteur d'autres polymérases : la liaison polymérase-promoteur entraîne une courbure de l'ADN pouvant favoriser l'ouverture de la double hélice au niveau de la séquence TATA. Le passage à l'état "promoteur ouvert" présente une cinétique rapide mais est thermodynamiquement défavorable. L'état ouvert ne peut être stabilisé que par l'hybride ARN :ADN. Pour cela, une grande concentration en nucléotides est nécessaire. Une trop faible concentration ne permet pas à la polymérase de démarrer la transcription.

La troisième partie, de +1 à +6, rassemble les premières bases transcrites par la polymérase. La transcription de ces bases est la phase dite abortive, et est caractérisée par des cycles multiples de dissociation/réinitiation avec transcription de quelques bases et relargage de l'ARN transcrit. Pendant cette phase, le complexe ADN-polymérase est peu stable et la polymérase reste en contact avec la séquence de reconnaissance spécifique. Au cours de ces cycles, la polymérase a une probabilité de transcrire plus que quelques bases et de passer à un état plus stable : l'élongation (voir plus bas). La séquence des premières bases transcrites est importante pour

l'affinité polymérase-promoteur, mais aussi pour le passage vers l'élongation. La phase abortive dépend cependant de la séquence à transcrire et du promoteur ; elle peut alors dans certains cas avoir lieu sur plus de 6 bases.

La polymérase avance jusqu'à la position +8 en étant toujours liée au promoteur. Pour ce faire, elle doit soit s'étirer, soit comprimer l'ADN. L'explication généralement retenue de ce phénomène est la dernière, dite du "scrunching"⁶. Ce modèle semble confirmé par la structure du complexe d'initiation ainsi que par diverses études [35, 10, 40].

Quand l'hybride ARN :ADN atteint une longueur de 8 à 11 bases, l'encombrement de l'ADN accumulé entraînerait le détachement de la polymérase du promoteur. Temiakov et al. [55] ont supposé que des interactions entre une partie de l'enzyme et l'ARN sortant puissent contribuer aussi à l'abandon de la phase abortive par un mécanisme allostérique (i.e. un changement de conformation de la protéine). En utilisant une méthode originale⁷, Mukherjee et al. [40] ont pu établir des contacts existants entre polymérase, ADN et ARN, en déduire les changements de conformations de certains domaines, couplés à l'avancée de l'enzyme sur l'ADN, à différentes étapes de l'initiation jusqu'à l'élongation (en +13). Leurs données semblent confirmer l'hypothèse du "scrunching".

Les changements de conformations qui accompagnent la passage à l'élongation seront discutés dans les parties 2.4 et 2.4.4.

2.2.4 L'élongation

Les caractéristiques de la phase d'élongation sont très différentes de celles observées en phase d'initiation. Le complexe ADN/polymérase/ARN en élongation présente une grande stabilité : la polymérase est dite processive. La processivité p se définit par :

$$p = \frac{k_{el}}{k_{el} + k_{diss}}$$

où k_{el} désigne la constante de vitesse pour avancer au nucléotide suivant et k_{diss} la constante de vitesse liée à la dissociation du complexe polymérase-ADN. Dans le cas de l'ARNPT7 en phase d'élongation, $k_{diss} \ll k_{el}$ et donc : $p \lesssim 1$.

Pour obtenir cette stabilité du complexe, la polymérase en élongation établit d'autres contacts que ceux observés en phase d'initiation (cf. paragraphe 2.4.4).

Les valeurs des K_m de l'ARNPT7 ont notamment été mesurées par Guajardo et Sousa [74] et Arnold et al. [79]. Le tableau suivant résume leurs résultats (les K_m sont donnés en μM) :

⁶L'autre hypothèse d'étirement de la polymérase est appelée "inchworming" en anglais.

⁷Un agent portant un ion Fe^{2+} chélaté est conjugué avec un acide aminé particulier (la cystéine) placé dans des positions choisies dans la séquence de la protéine ; l'ion Fe^{2+} génère des radicaux $\text{OH}\cdot$ sous l'exposition à de l'eau oxygénée et induit une coupure localisée de l'acide nucléique. L'analyse par gel d'électrophorèse permet ensuite de caractériser les points de contact entre l'ADN (ou l'ARN) et la cystéine conjuguée.

base	Arnold [79]	Guajardo [74]
A	76 ± 22	nd
C	34 ± 7	nd
G	76 ± 12	41 ± 5
U	33 ± 6	nd

Les K_m d'Arnold et al. sont obtenus sur des transcrits longs de 2 à 3 kb mais incluent l'initiation. Le K_m de Guajardo et Sousa est mesuré en phase d'élongation, sur un poly(dC) (i.e. un ADN dont la séquence est CCCC...). Le K_m est une variable qui dépend de manière significative du contexte de séquence, ce qui explique les différences entre les valeurs mesurées.

La fidélité de l'ARNPT7 est comparable à celle du fragment Klenow⁸ : ~1 erreur pour 20000 bases incorporées [29], bien que l'ARNPT7 ne présente *a priori* aucune fonction de correction d'erreur ("proofreading") liée à une activité exonucléase⁹. Les constantes de la réaction de pyrophosphorylation :



ont été mesurées avec 1 mM PPi [29] (concentration des conditions physiologiques). Les résultats montrent que la pyrophosphorylation (réaction inverse à l'hydrolyse) n'est apparemment pas un mode utilisée par l'ARNPT7 pour la discrimination entre NTP correct et incorrects. La discrimination lors de l'incorporation fait donc intervenir un mécanisme de sélection particulièrement efficace sans doute basé sur des contraintes stériques : une particularité d'un appariement du type Watson-Crick est de garder constant la distance inter-brin quelque soit la paire (AU ou GC) ; si cette distance caractéristique, signature du bon appariement, n'est pas respectée, la polymérase est supposée ne pas pouvoir engager l'étape de catalyse.

Enfin, la vitesse de transcription de l'ARNPT7 a été mesurée *in vitro* [62, 13, 31] et *in vivo* [13, 14]. Elle est de l'ordre de 230-240 b/s à 37°C dans les deux cas. L'ARNPT7 est donc beaucoup plus rapide que les autres ARNP (quelques dizaines de bases par secondes seulement pour l'ARNP d'*E. coli* ou les ARNP d'eucaryotes supérieurs).

2.2.5 La terminaison

Pour l'ARNPT7, il existe deux types de séquences "terminatrices" : (i) les terminateurs qui contiennent une séquence permettant à l'ARN de former une boucle¹⁰ qui déstabilise les interactions ARN/polymérase, et suivie d'une série de U qui déstabilise les interactions ARN :ADN (comme les terminateurs ρ -indépendants de l'ARNP d'*E. coli*) ; (ii) les terminateurs qui contiennent la séquence synthétisant AUCUGUU (cf. paragraphe sur le domaine N-terminal page 29), suivie

⁸Fragment de l'ADNP d'*E. coli* obtenu par protéolyse partielle, qui garde l'activité de polymérisation mais qui a perdu l'activité exonucléase 5'-3', et qui porte une mutation supprimant l'activité exonucléase 3'-5'.

⁹Certaines ADNP ont la capacité d'inverser temporairement le processus d'incorporation si une erreur a été commise. C'est un processus de correction d'erreur.

¹⁰ou "épinge à cheveux", "hairpin" en anglais.

d'une série de U. Cette séquence a été trouvée dans la jonction concatémère de l'ADN de T7, mais elle y est non suivie de U ; elle pourrait alors agir comme site de pause.

La séquence de terminaison est particulière : elle fait passer la processivité de ~ 1 à ~ 10 ! Les séquences de terminaison doivent donc modifier la structure du site actif afin de diminuer la constante d'élongation k_{el} , en même temps qu'elles augmentent la constante de dissociation en déstabilisant le complexe ADN-protéine.

2.3 Les analyses de séquences d'acides aminés

L'analyse des séquences protéiques (enchaînement d'acides aminés) et leur comparaison entre espèces est la base de l'analyse de l'évolution moléculaire. En effet, la conservation d'une séquence d'acides aminés peut témoigner de l'évolution à partir d'un ancêtre commun. Ce type d'étude fait partie des "analyses structure-fonction", qui proposent les séquences jouant un rôle essentiel dans l'activité biologique et la structure des protéines : les séquences partagées sont supposées être associées à des fonctions communes au sein des protéines examinées. Ce type d'analyse permet alors de guider des expériences de mutagenèse (mutations génétiques conduisant à un remplacement d'un ou de plusieurs acides aminés dans la composition d'une protéine) en vue de caractériser notamment les liens entre résidus et activité enzymatique.

On distingue plusieurs niveaux de structure pour les protéines¹¹. La structure primaire correspond à la séquence (ou l'enchaînement) des acides aminés qui constituent la protéine. Les acides aminés peuvent interagir entre eux¹² pour former des repliements particuliers : essentiellement des hélices, appelées hélices α , et des plans appelés feuillets β . L'ARNPT7 par exemple est composée essentiellement d'hélices α . Ces repliements constituent la structure secondaire. D'autres interactions entre domaines donnent enfin à la protéine sa structure tridimensionnelle, ces arrangements correspondent à la structure tertiaire.

La comparaison de la composition en acides aminés (alignement de séquences) de différentes polymérases a permis de distinguer des séquences communes [1, 2, 3] appelées motifs. Malgré les différences entre les environnements (noyau de cellule eucaryote, mitochondrie ou cytoplasme de bactérie) et/ou les organismes dans lesquels elles agissent, les polymérases à une sous-unité présentent des homologies (*i.e.* des séquences d'acides aminés identiques, reliées à une fonction particulière de la protéine) qui permettent de les réunir par "familles".

Il existe essentiellement deux niveaux d'homologie : à travers toutes les familles, et à l'intérieure de chaque famille. Il existe aussi des motifs communs suivant le substrat de la polymérase (ADN ou ARN). Les polymérases à une sous-unité se rangent en quatre familles [1, 46, 47] :

1. la famille "Pol I" comprenant le fragment Klenow de l'ADNP d'*E. coli*, l'ADNP des bactériophages T5 et T7, l'ARNP de T3 et T7, l'ADNP I de *Bacillus*, l'ADNP de *Thermus Aquaticus* (Taq)
2. la famille "pol α " : les ADNP d'eucaryotes (dont l'ADNP humaine α), l'ADNP du bactériophage T4, l'ADNP du bactériophage RB69

¹¹ voir aussi en annexe 9.6 pour plus de détails

¹² interactions électrostatiques, hydrophile/hydrophobe, Van der Waals...

		Motif A	Motif B	Motif C
ADNP (Pol α)	α hum. Rb69	856 illlDfnslypsii 407 vmsfDltslypsii	946 qkalKlta nsmYGclgf 556 qinrKlli nslYGalgn	998 viygdtdsimin 617 vlygdtdsiyvs
ADNP (Pol I)	E. coli T7	701 ivsaDy sqielri 471 qagiDa sglelrc	757 rrsaKainfgliYGmsaf 518 rdnaKt fiygflyGagde	876 mingvhDelvfe 648 ymawvhDeiqvg
ADNP (Pol β)	β rat	13 ggitDmlvelanfe		184 gaessgDmdvll
ARNP (Pol I)	T3 T7	534 plafDg scsqiqh 533 plafDg scsqiqh	628 rsvtKrsvmtlaYGskef 627 rsvtKrsvmtlaYGskef	805 sfalihDsfgti 806 sfalihDsfgti
RT (Pol I)	VIH 1	261 vtvldvgdayfsvp		335 viyqymDdlyvg

		Motif T/DxxGR
ADNP (Pol α)	α hum. Rb69	968 yakplaalvTykGREilmht 578 ydlrnat aiTt fGRmalqwi
ADNP (Pol I)	E. coli T7	655 vhtsyhqavTatGRlsstdp 416 ihgsvnpngavtGRathafp
ADNP (Pol β)	β rat	
ARNP (Pol I)	T3 T7	413 kaiwfpymDwrGRvyavpm 412 kaiwfpymDwrGRvyavsm
RT (Pol I)	VIH 1	450 tklgkagqvTnkGRqkvvpl
Plusieurs sous-unités	Taq β' yARNP II	615 rqnllgkrvDysGRsvivvg 337 rgnlmgkrvDfsaRtvisgd

FIG. 2.6 – Alignements de séquences de plusieurs polymérases : l'ADNP α humaine et l'ADNP du bactériophage Rb69 pour la famille pol α ; l'ADNP d'E. coli et l'ADNP du bactériophage T7, les ARNP des bactériophages T3 et T7, et la RT du VIH 1 pour la famille pol I ; l'ADNP β du rat pour la famille pol β ; la sous-unité β' de l'ARNP de Taq et la sous-unité la plus importante de l'ARN polymérase II de la levure (yARNP II). En majuscule sont signalés les résidus conservés. Au sein d'une même famille, on distingue des séquences communes qui ne sont pas mises en valeurs dans le tableau. On remarquera par exemple que les séquences des phages T3 et T7 sont quasiment identiques. Les similitudes peuvent apparaître par la conservations de résidus chargés ou hydrophobes (non indiqués dans le tableau). Pour plus de détail, voir [2, 3, 1]

3. les transcriptases inverses (RT) dont la RT du VIH 1 et la RT du virus *Moloney murine leukemia*
4. l'ADNP β humaine et du rat

L'ADNP III bactérienne ne semble se ranger dans aucune des quatre familles et en formerait peut-être une cinquième [47].

Les polymérases des familles Pol I, RT et β ont la même forme tridimensionnelle, traditionnellement représentée par une main droite [6], alors que les polymérases de la famille Pol α ont la forme d'un disque avec un trou central [48]. Toutes les polymérases partagent la même topologie pour le site catalytique, mise à part la polymérase β qui pourrait avoir évolué à partir d'un ancêtre différent [46, 4].

Pour les familles Pol I et RT, on nomme communément motifs A et C, les deux séquences participant à la catalyse de la liaison phosphodiester dans le site actif ; deux acides aspartiques

sont notamment conservés (cf. figure 2.6). On retrouve ces deux résidus : (i) chez la famille Pol α , avec des séquences alentours propres à cette famille (nommées région I et II) [48], (ii) chez la polymérase β et (iii) chez les ARNP à plusieurs sous-unités [53]. Le rôle exact de ces deux acides aminés sera discuté dans la partie suivante.

Un troisième motif est conservé parmi la famille Pol I, appelé motif B, dont les acides aminés font des contacts avec le brin codant mais aussi avec le NTP entrant. Les trois résidus conservés sont : une Lysine, une Tyrosine, et une Glycine¹³. On retrouve une région similaire, avec les trois acides aminés, chez la famille Pol α ("région III") ; les résidus y ont la même fonction, mais la similitude serait un exemple d'évolution convergente, plutôt qu'une évolution à partir d'un ancêtre commun [48]. Pour les polymérases ARN dépendantes, il existe aussi un motif conservé (motif B', non représenté sur la figure 2.6) qui fait des contacts avec l'ARN, i.e. jouant le même rôle de contact polymérase-substrat [39, 2].

Enfin, un motif est partagé avec les polymérases à plusieurs sous-unités : T/DxxGR¹⁴ qui fait des contacts avec le brin codant [39, 3]. Chez l'ARNPT7, ce motif se trouve près du site actif (421-425) et est impliqué dans les interaction ARN :ADN [58]. La séquence est particulièrement bien conservée, mais elle n'a pas la même fonction chez toutes les polymérases.

2.4 Structure tridimensionnelle de l'ARN polymérase de T7 et fonctions associées aux différents domaines

Par la suite, on ne considère que les polymérases à une sous-unité sauf précision explicite.

La structure tridimensionnelle d'une enzyme est importante pour comprendre son fonctionnement et quels contacts font certains acides aminés avec son substrat. La seule connaissance des séquences protéiques ne renseigne que partiellement sur l'arrangement tridimensionnel de la chaîne d'acides aminés, et sur les fonctions que peuvent remplir certaines séquences.

Ce sont les études de radiocristallographie par rayon X ou de spectroscopie par RMN sur les protéines seules ou sur les complexes protéine-substrat qui ont permis d'accéder aux structures tridimensionnelles des protéines. En combinant ces résultats avec des expériences de biologie moléculaire menées sur des protéines modifiées génétiquement (par mutation, insertion ou délétion¹⁵), des fonctions spécifiques de certains domaines des polymérases ont pu être identifiées.

L'ARNPT7, contrairement à la majorité des polymérases, n'est composée que d'une seule unité¹⁶ de 883 acides aminés. Ses dimensions sont 75x75x65 Å³ et son poids moléculaire est de ~100 kg/mol [27]. Il existe aujourd'hui six structures cristallographiques publiées de l'ARNPT7 : une structure de la polymérase seule [27] ; une structure de la polymérase avec le lysozyme de T7 [43], un inhibiteur connu ; une structure d'un complexe polymérase-promoteur [44] ; une structure d'un complexe oligonucléotide-polymérase en phase d'initiation [45], et enfin deux

¹³Pour la nomenclature des acides aminés, cf. annexe 9.7 page 169

¹⁴T/D signifie "T ou D" : les ARNP portent un D (acide aspartique) et les ADNP un T (Thréonine) ; x désigne n'importe quel acide aminé : le second x est souvent conservé à l'intérieur d'une famille.

¹⁵On modifie le gène codant pour la synthèse de la protéine en changeant le code génétique ; en exprimant le gène, on obtient une protéine avec un ou plusieurs acides aminés modifiés, insérés ou retirés.

¹⁶Certaines protéines consistent en fait en une association de plusieurs polypeptides que l'on appelle sous-unités.

structures du complexe en élongation [60, 42]. A cette date, les structures en élongation ne sont pas disponibles ; celle du complexe d'initiation est représentée sur la figure 2.7.

2.4.1 Les domaines de l'ARNPT7 partagés parmi les membres de la famille Pol I

L'image courante employée pour décrire la structure des polymérases de la famille pol I est celle d'une main droite dont les doigts sont repliés sur le substrat (à la manière d'un coureur de relais tenant le témoin). La "paume" représente le site catalytique, les "doigts" sont responsables des principales interactions entre la protéine et le brin codant du substrat, et le "pouce", flexible, qui se replie sur le substrat, aurait pour fonction de "tenir" l'ADN durant la transcription.

On décrit ci-dessous ces différentes parties chez l'ARNPT7. Entre parenthèse sont indiqués les acides aminés correspondant à chaque domaine. Le "découpage" de la séquence de l'ARNPT7 correspond à celui proposé par Rui Sousa [26].

Le pouce (acides aminés 330-414) est composé essentiellement d'une hélice α . Des mutations ou des délétions dans cette région diminuent la processivité et augmentent la dissociation entre la polymérase et son substrat, chez l'ARNPT7 [32, 34], la RT du VIH [19] et le fragment Klenow de l'ADNP d'*E. coli* [18].

Sur l'ARNPT7, la séquence 391-395 est composée d'acides aminés rassemblant des charges positives, et faisant des contacts avec les ribo-phosphates de l'ARN, à 4-6 bases de l'extrémité 3'. Cette observation est corroborée par les données de Mukherjee et al. [40] qui concluent que le pouce est susceptible de se courber vers l'ARN et le site actif lors de l'initiation, quand la polymérase passe de +4 à +6 ; la base du mouvement serait situé entre les résidus 388 et 393. Ce changement de conformation est supposé stabiliser le complexe d'élongation, et pourrait être favorisé par des interactions ARN :pouce. Des mutations dans cette séquence accroissent également la dissociation [33]. Toutes ces observations laissent penser que le pouce a pour fonction de "tenir" la polymérase sur l'ADN.

Les mutations B388A¹⁷ et Y385A ne réduisent pas la stabilité du complexe d'élongation mais réduisent l'apparition des pauses et des arrêts à la jonction concatémer de l'ADN de T7¹⁸ [33], suggérant un rôle possible de ces résidus dans le mécanisme de reconnaissance des sites de pause et d'arrêt.

La paume (acides aminés 414-448, 535-538, 787-819) est composée de quatre feuillets β , et comprend les motifs conservés A et C. C'est le domaine dans lequel se trouve le site catalytique, et notamment les deux résidus hautement conservés : les deux acides aspartiques, Asp 537 et Asp 812 pour l'ARNPT7. Des mutations de ces deux acides aminés conduisent, suivant la modification effectuée, à une perte complète ou très importante de l'activité [31, 16]. Ces deux résidus sont supposés être impliqués dans la stabilisation dans le site actif des ions Mg^{2+}

¹⁷XnY signifie : dans la chaîne d'acides aminés composant la protéine, l'acide aminé X, n^{eme} résidu de la chaîne, est remplacé par mutation génétique par l'acide aminé Y.

¹⁸une séquence particulière découverte par hasard et connue pour entraîner pause ou arrêt chez l'ARNPT7

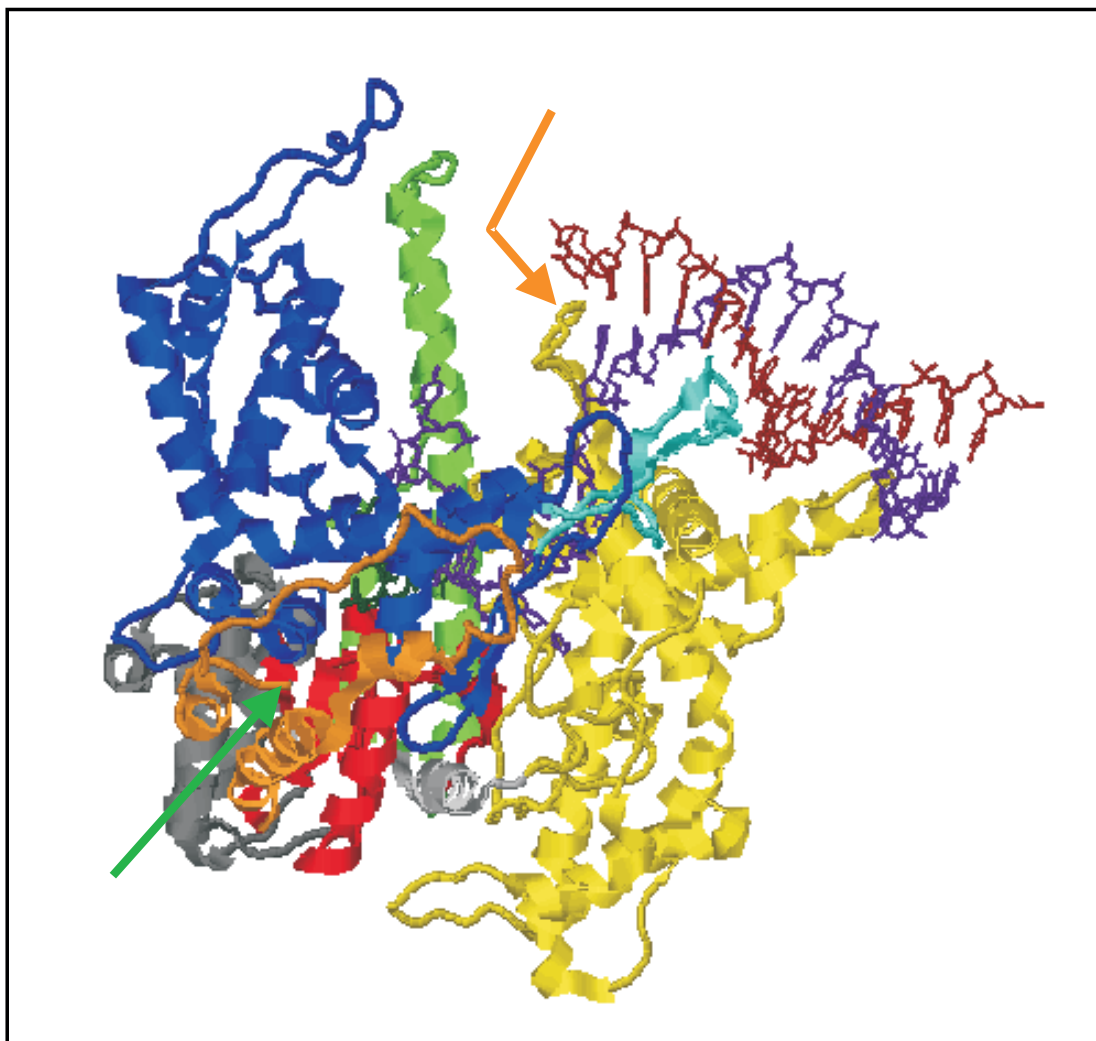


FIG. 2.7 – Structure cristallographique d'un complexe d'initiation de l'ARNPT7 proposée par Cheetham et al. [45] (code 1QLN sur ProteinDataBank). Le domaine N-terminal est en jaune, le pouce en vert, les doigts en bleu, la paume en rouge, la boucle C-terminale en orange, la boucle de reconnaissance spécifique en bleu clair, le groupement d'hélices α en gris foncé. Le brin codant est en violet, le brin non codant en marron. On distingue l'ARN en vert foncé derrière les doigts, légèrement au dessus de la paume. La flèche orange indique la boucle β séparant les deux brins d'ADN, et la flèche verte indique l'extrémité C-terminale, proche du site catalytique. L'hélice α en gris clair (310-330) n'est pas répertoriée par Sousa [26].

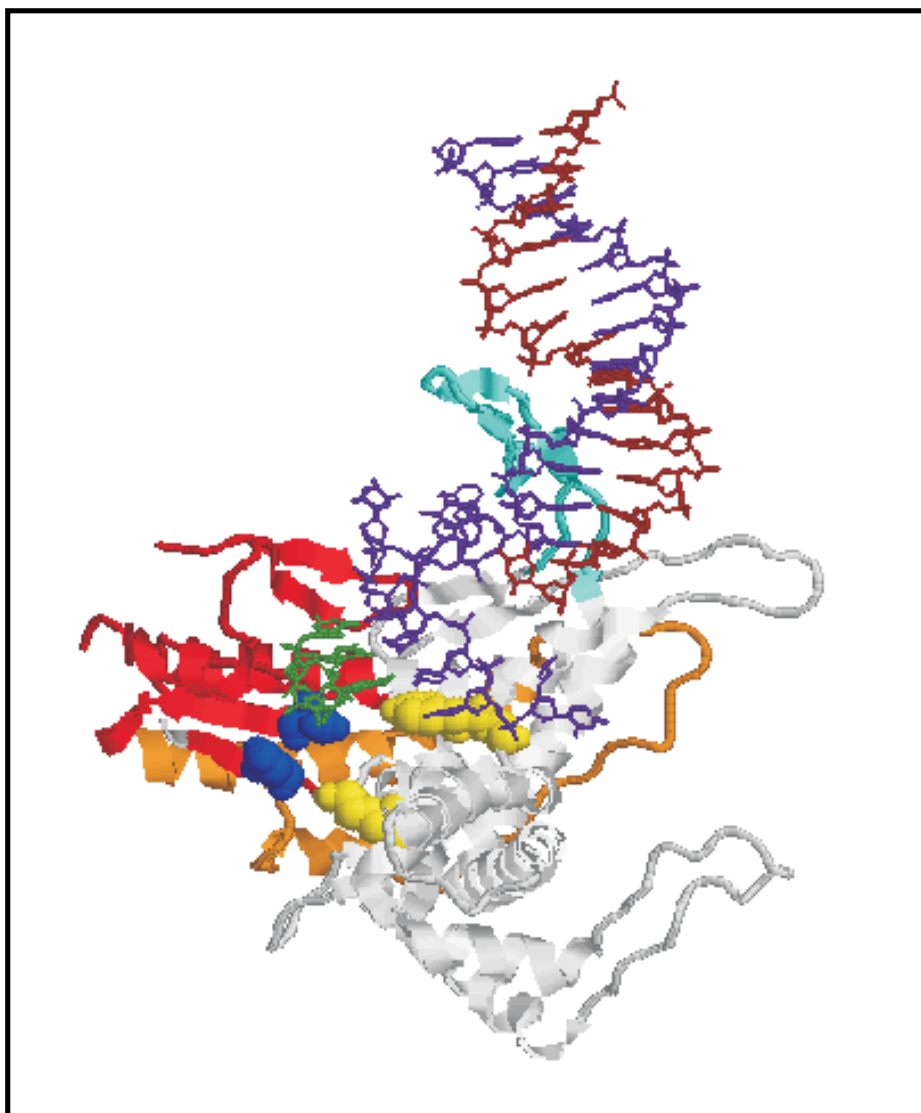


FIG. 2.8 – Structure d'après Cheetham et al. [45]. Pour plus de clarté, le groupements de 4 hélices α , le domaine N-terminal et le pouce ont été retirés. Les doigts sont en gris clair, la paume en rouge, la boucle C-terminale en orange, la boucle de reconnaissance spécifique en bleu clair. Le brin codant est en violet, le brin non codant en marron, l'ARN est visible, en vert clair. Les résidus Asp 537 et Asp 812 de la paume sont en bleu et les résidus Lys 631, Tyr 639 et Gly 640 des doigts sont en jaune, avec une représentation différente ("spacefill"). Ces cinq résidus sont hautement conservés dans la famille Pol I (cf. texte). L'extrémité C-terminale se trouve juste derrière l'acide aspartique Asp 537 au premier plan.

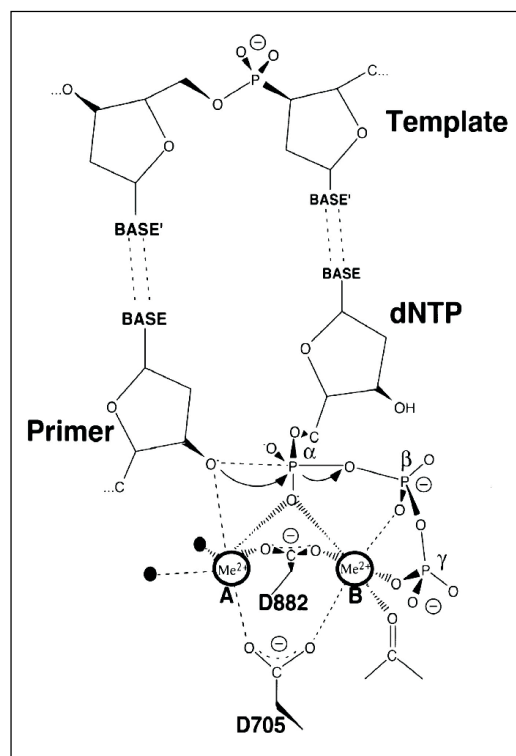
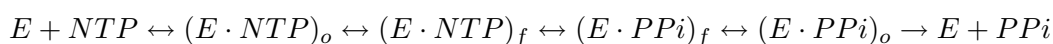


FIG. 2.9 – Mécanisme impliquant deux ions métalliques dans la catalyse chez les ADNP [46], ici Klenow. Pour l'ARNPT7, D705 et D882 sont à remplacer respectivement par D537 et D812, et les dNTP seraient remplacés par des rNTP. Dans ce modèle, les groupements COO^- des radicaux des acides aspartiques (Asp ou D) maintiennent les ions métalliques (Mg^{2+} pour les polymérases), qui favorisent la catalyse de la liaison phosphodiester.

catalysant la liaison phosphodiester (i.e. l'addition du NTP entrant à l'extrémité 3' de la chaîne d'ARN naissante). Le phosphate α du NTP entrant est placé juste au dessus des deux acides aspartiques. Chez l'ADNP de T7, les deux ions métalliques sont situés à proximité de ces acides [50] (figure 2.9). La catalyse chez l'ARNPT7 se déroulerait suivant le modèle de catalyse à deux ions métalliques, initialement proposé pour les ADNP [46] : la position des deux ions Mg^{2+} serait maintenue via une interaction avec les acides aspartiques (Asp : radical acide $-\text{CH}_2-\text{COO}^-$) ; le premier ion (noté A sur la figure 2.9) permettrait de rendre l'extrémité 3'-OH de l'ARN naissant plus nucléophile, favorisant une liaison entre l'oxygène et le phosphate α du NTP entrant ; le second (noté B) stabiliserait l'état pentacovalent du phosphate en permettant la formation d'un angle à 90° de la liaison O-P-O, et facilitant ainsi le départ du pyrophosphate lors de l'hydrolyse.

La proposition d'un tel mécanisme est basée sur les homologies dans le site actif entre les ADNP, les ARNP et les RT, ainsi que sur les différentes structures cristallographiques. De plus, l'arrangement tridimensionnel commun des composants catalytiques chez des polymérases non homologues comme la polymérase β [46] ou les ARNP à plusieurs sous-unités [53], renforcent l'existence d'un mécanisme commun pour cette fonction partagée par toutes les polymérases.

Les doigts (acides aminés 539-738, 771-786) incluent une hélice α particulière qui comprend le motif B. Pour les membres de la famille Pol I, les doigts font l'essentiel des contacts avec le brin codant. Chez l'ADNP de *Taq*, l'hélice en question subit un changement de conformation durant chaque cycle d'addition du nucléotide : une rotation de l'hélice fait passer l'enzyme d'un état "ouvert" incompétent à un état "fermé" compétent [49]. Le mouvement des doigts est observé chez la polymérase β , l'ADNP de T7 [47] et la RT du VIH 1 [7]. La fixation du nucléotide pourrait fournir l'énergie pour le changement de conformation. Le cycle de réaction peut alors être décrit par :



Les indices *o* et *f* indiquent si la polymérase est dans l'état "ouvert" ou "fermé". Cette idée reste à confirmer pour l'ARNPT7 (cf 2.4.4). Mais le travail récent de Mukherjee et al. semble indiquer un changement de conformation des doigts ou des interactions avec l'ADN [40]. Chez l'ARNPT7, les résidus 627-637 incluant Lys 631 conservé (Lys 522 chez l'ADNP de T7, Lys 758 chez Klenow) pourraient interagir avec la partie triphosphate du NTP entrant d'après les structures cristallographiques [21, 45, 50]. En interagissant avec le phosphate α du NTP entrant, il stabiliserait l'état pentacovalent [47].

Plusieurs résidus des doigts sont impliqués dans la reconnaissance des nucléotides, chez les ADN et les ARN polymérases. En effet, chez les ADNP, la plupart des mutations conduisant à des mésincorporations sont celles opérées dans les doigts. Chez l'ARNPT7, les mutations G640A, F644A et G645A augmentent également la mésincorporation, mais ne favorisent pas l'extension du mésappariement : ces résidus pourraient stabiliser la conformation "ouverte" incompétente, réduisant ainsi les mésincorporations [29] (l'effet des trois mutations serait de diminuer cette stabilité favorisant la mésincorporation). Une reconnaissance complète du NTP (ou dNTP pour les ADNP) entrant comprend :

1. la reconnaissance du groupe hydroxyl en 3', groupe nécessaire pour effectuer la liaison phosphodiester suivante
2. la discrimination entre le 2'H des dNTP et le 2'OH des NTP (le groupe hydroxyl qui marque la différence entre ADN et ARN)
3. le choix du "bon" NTP à incorporer parmi les quatre (adénine, guanine, cytosine et thymine/uracile).

Les polymérases ne sont pas toutes capables de reconnaître le 3'OH. Chez les ADNP, un résidu aromatique (Tyr ou Phe) se trouve proche des phosphates du NTP entrant (Tyr 526 pour l'ADNPT7, Phe 762 pour Klenow). Les polymérases possédant une Phenylalanine (radical : $-CH_2 - C_6H_5$) reconnaissent le 3'OH, contrairement aux polymérases portant une Tyrosine ($-CH_2 - C_6H_4OH$). Il a été montré que la présence ou non du groupement OH sur l'acide aminé (Phe ou Tyr) est capitale pour la reconnaissance [17], mais les raisons n'en sont pas évidentes [17, 23]. Ce n'est en tout cas pas un simple problème d'encombrement dû à la présence ou non des OH.

Concernant la discrimination, chez les ADNP, entre dNTP et NTP (i.e. 2'H ou 2'OH), Kiefer et al. [24] ont proposé l'idée qu'elle puisse se faire grâce à certains acides aminés par des contraintes stériques. Un résidu est particulièrement impliqué : l'acide Glutamique Glu conservé chez les ADNP (Glu 480 pour l'ADNP de T7, Glu 710 pour Klenow) [20]. L'acide aminé correspondant chez l'ARNPT7 est la glycine Gly 542 conservée parmi les phages, qui est un résidu neutre contrairement à l'acide Glutamique : la présence du groupe carboxyl sur l'acide Glutamique empêcherait le 2'OH du NTP de pouvoir entrer dans le site actif des ADNP [45]. Chez l'ARNPT7, la tyrosine positionnée en 639 est impliquée dans la reconnaissance du 2'OH, via une liaison hydrogène entre le groupement hydroxyl de cet acide aminé et l'extrémité 2'-OH du NTP entrant : la mutation Y639F engendre l'incorporation de 2'-dNTP, sans pour autant modifier la catalyse [15, 28, 30, 37].

Ce résidu Tyrosine (Tyr 639 chez l'ARNPT7) est conservé chez les ADNP (Tyr 530 chez l'ADNP de T7, Tyr 714 chez *Bacillus steatothermophilus*, Tyr 766 pour Klenow) [24, 20] où il a une autre fonction : le résidu est impliqué dans les interactions entre l'enzyme et le dNTP et joue un rôle dans la fidélité (capacité à incorporer le "bon" dNTP) [22, 21]. L'environnement structural détermine donc la fonction de ce résidu qui joue un rôle de discrimination entre dNTP et NTP uniquement chez les ARNP [20]. Chez l'ARNPT7, on ne connaît pas les résidus qui sont impliqués dans la reconnaissance du "bon" nucléotide. Cette Tyrosine, à la base de l'hélice soumise au changement de conformation observé chez les ADNP et proche du site catalytique, interagit avec le brin codant et le nucléotide entrant de façon différente dans l'état ouvert et l'état fermé : dans l'état ouvert, le résidu fait des interactions d'empilement avec la base du brin codant en déformant le brin et empêchant le nucléotide entrant de se positionner correctement pour l'incorporation ; dans l'état fermé, la Tyrosine laisse l'espace qu'elle occupait permettant au nucléotide de s'apparier et de se positionner correctement pour la catalyse [49]. Si la base n'est pas complémentaire, un encombrement stérique défavorise le passage à l'état fermé. Il est fortement supposé que ce mécanisme soit le même pour l'ARNPT7 [59] : la structure de Cheetham et al. [45] serait celle du complexe ouvert, d'après la position de Tyr 639 interagissant avec le brin codant et déformant celui-ci (cf. figure 2.10).

Le changement d'état "ouvert" / "fermé" est pensé comme une étape limitante de l'addition de nucléotide, et est proposé comme étape critique de la discrimination entre NTP complémentaires et non complémentaires [26, 47].

Quoiqu'il en soit, les doigts constituent un domaine déterminant vis à vis de la liaison du NTP entrant, de sa discrimination et de la différenciation entre dNTP et NTP.

2.4.2 Les domaines propres à l'ARN polymérase de T7

Les domaines propres des polymérases n'ont en général aucune similitude d'une enzyme à l'autre. Ils remplissent des fonctions spécifiques à chaque polymérase [39]. Certaines régions présentées ci-dessous sont cependant conservées chez les phage T3 et SP6.

Le domaine N-terminal (acides aminés 1-311) est le plus grand des domaines propres

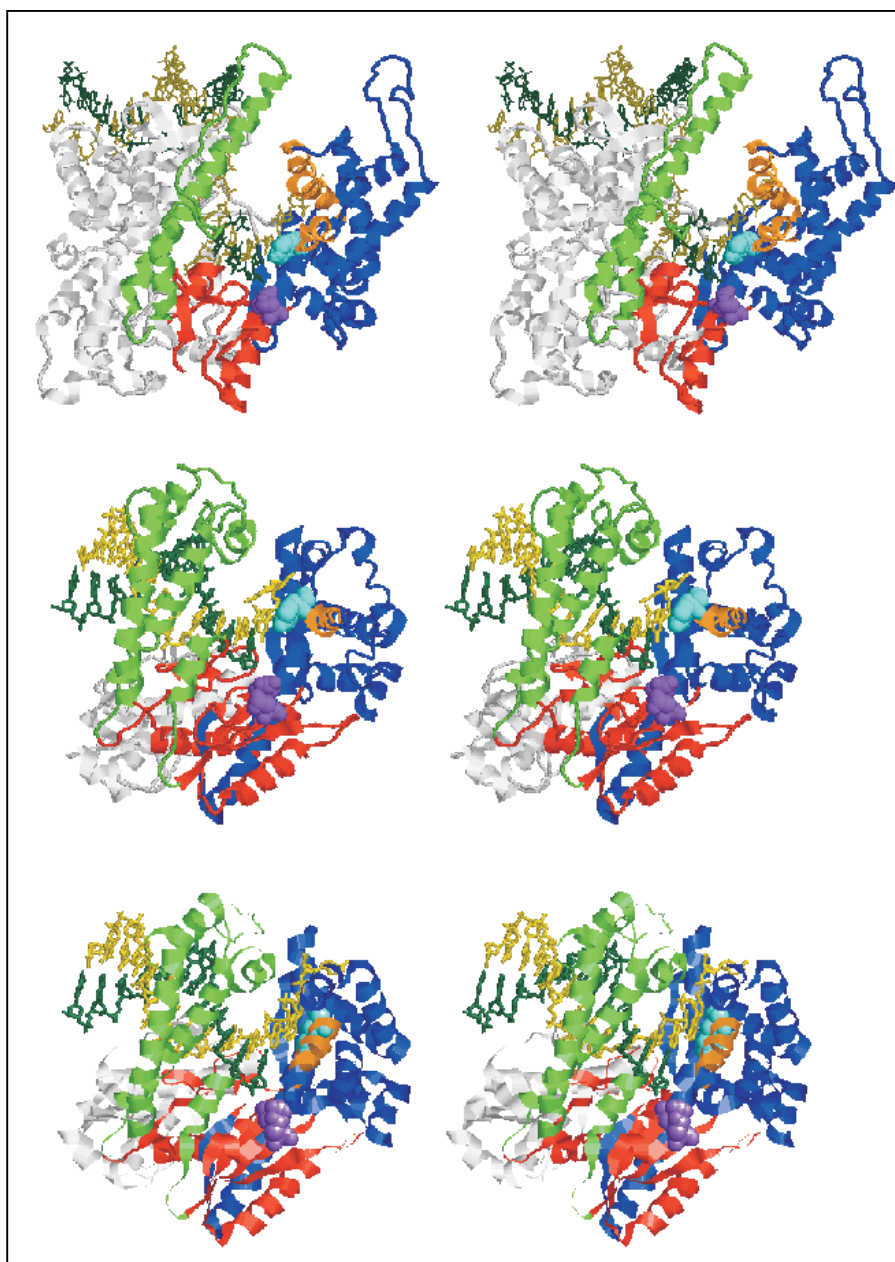


FIG. 2.10 — Comparaison entre les structures du complexe d'initiation de l'ARNPT7 [45] (en haut) et le fragment large de l'ADNP de *Thermus aquaticus* (Taq) [49] (au milieu et en bas). Dans les trois structures la paume est en rouge, les doigts en bleu, le pouce en vert et le reste de la structure en gris clair ; pour l'ARNPT7, le groupement à 4 hélices ainsi que la boucle C-terminale ont été retirés ; les acides aspartiques conservés impliqués dans la catalyse (Asp 537 et Asp 812 pour l'ARNPT7 et Asp 610 et Asp 785 pour l'ADNP de Taq) sont représentés en "spacefill" en violet ; la Tyrosine conservée (Tyr 639 pour l'ARNPT7 et Tyr 671 pour l'ADNP de Taq) est représentée également en "spacefill" en bleu clair. L'hélice O qui subit un changement d'orientation lors du passage de l'état ouvert à l'état fermé chez l'ADNP de Taq est en orange. Les hélices supposée correspondre à l'hélice O chez l'ARNPT7 sont l'hélice Y et l'hélice Z [59] et apparaissent également en orange. L'ADN et l'ARN (pour l'ARNPT7) sont représentés en "stick", le brin codant en jaune, le brin "primer" de l'ADNP, le brin non codant et l'ARN de l'ARNP en vert. La structure du milieu représente l'état ouvert de l'ADNP : Tyr 671 interagit par empilement avec la base du brin codant déformé et empêche le positionnement correct du dNTP entrant. La structure du bas représente l'état fermé de l'ADNP : l'hélice O a pivoté et la tyrosine 671 a laissé un espace libre pour la base du brin codant, permettant une position adéquate pour l'appariement et la catalyse. La disposition des résidus et de l'ADN sur la structure de l'ARNPT7 suggère qu'elle se trouve dans l'état ouvert. (codes ProteinDataBank : 1QLN pour l'ARNPT7, 2KQT pour la structure "ouverte" de l'ADNP de Taq et 3KQT pour la structure "fermée").

à l'ARNPT7. Il joue un rôle dans la reconnaissance du promoteur. Il courbe notamment la partie riche en AT du promoteur. La structure indique qu'une partie (résidus 230-250, "épingle à cheveux β ") s'intercale entre les deux brins de l'ADN, ouvrant la séquence promoteur et établissant des contacts par empilement avec les bases exposées. Lors de la phase abortive, ce sous-domaine subit des changements de conformations importants qui stabilisent le complexe d'élongation ([40] et cf 2.4.4). Des mutations ou délétions effectuées dans la région 160-195 influencent l'efficacité dans la reconnaissance de certains types de séquences de pause ou de terminaison [56, 57]. Cette région est bien conservée chez les phages [57]; elle pourrait donc être impliqué dans le mécanisme de reconnaissance de pause, et est susceptible d'être en contact avec l'ARN naissant comme le montre certaines études (cf. paragraphe suivant *Sortie de l'ARN* et 2.4.4).

La boucle de reconnaissance du promoteur ("specificity loop") (acides aminés 739-770) interagit avec les bases -7 à -11 du promoteur via les résidus 746, 748, 756 et 758 [44]. Elle est supposée jouer un rôle dans le passage de la phase d'initiation à la phase d'élongation, via des interactions avec les bases hybridées ADN :ARN de la bulle de transcription [55].

La boucle C-terminale (acides aminés 820-883) présente la particularité d'exposer à la surface de la polymérase les résidus 820-881, et d'avoir l'extrémité Phe 882-Ala 883-COOH (séquence appelée "pied") dans une poche proche du site actif. La séquence C-terminale et sa position sont hautement conservées parmi les ARNP de phages [63]. Le pied est flexible en solution [63], peu ordonné d'après sa carte de densité électronique [43], et sa séquence est importante pour l'activité de l'enzyme [63].

Chez l'ARNPT7, la boucle C-terminale permet la fixation d'un inhibiteur, le lysozyme de T7, sur la surface extérieure, facilitant l'extraction de l'extrémité du C-terminal de sa position adjacente au site actif [43]. Curieusement, le lysozyme de T7 n'est pas actif en phase d'élongation; pourtant, l'extrémité du domaine C-terminal est impliquée dans le processus d'élongation: une mutation sur Phe 882 augmente le K_m (suggérant un rôle dans la reconnaissance du NTP pour ce résidu) [27] et diminue la processivité [25]; Lykke-Anderson et Christiansen ont montré qu'une modification dans le groupe carboxyl du Ala 883 entraîne une baisse d'activité, dépendante de la concentration en magnésium [11]. Dans la phase d'élongation, le lysozyme de T7 n'est donc plus capable d'éloigner l'extrémité C-terminale du site actif. L'élongation doit donc défavoriser les interactions entre le lysozyme de T7 et la polymérase et/ou la position de l'extrémité C-terminale doit être stabilisée lors du passage à la phase d'élongation. Utilisant entre autre une carboxypeptidase¹⁹, Huang et al [38] ont montré que la résistance du complexe d'élongation au T7 lysozyme serait due à l'établissement d'interactions entre la polymérase et l'ARN (notamment l'extrémité 3' de ARN). Dans la structure du complexe d'initiation, Graham et al. [45] notent que l'extrémité C-terminale se trouve trop loin (8 Å) des résidus aspartiques du site actif pour être impliquée dans la catalyse, contrairement à ce qu'ont conclu Lykke-Anderson et Christiansen. On peut donc supposer qu'un changement de conformation et/ou les interactions nouvellement

¹⁹enzyme clivant les résidus portant un groupe carboxyl

établies avec l'ARN, qui accompagne(ent) le passage à la phase d'élongation rapproche(ent) l'extrémité du C-terminal du site actif. Temiakov et al. [55] ont mis en évidence des contacts entre l'ARN naissant (à ≈ 8 bases de l'extrémité 3' de l'ARN) et la boucle de reconnaissance du promoteur : ils pensent que cette dernière pourrait jouer, par ces interactions avec l'ARN, un rôle dans la détachement du promoteur.

Prenant en compte l'ensemble de ces données, on peut faire l'hypothèse suivante : le passage à la phase d'élongation pourrait s'accompagner d'un changement d'orientation de la boucle de reconnaissance du promoteur, laissant alors un accès libre à la boucle C-terminale pour se rapprocher du site actif et établir des contacts avec l'ARN ; le déplacement de la boucle C-terminale moins exposée vers l'extérieur, ainsi que les contacts entre l'ARN et l'extrémité C-terminale défavoriseraient l'interaction entre le lysozyme de T7 et la surface extérieure de la boucle C-terminale, diminuant ainsi l'activité inhibitrice du lysozyme de T7.

Le groupe de quatre hélices empilées ("extra 4-helix bundle") (acides aminés 449-531), exposé vers l'extérieur, mais proche du site actif, n'a pas de fonction connue actuellement. Des mutants auxquels on a retiré cette région s'agrègent et ne peuvent se resolubiliser vers une conformation active. D'autres mutations effectuées dans cette région conduisent une activité réduite [26]. Il est possible que le rôle de ce domaine soit de protéger des éléments hydrophobes de la protéine. Il a peut-être également un rôle structural en favorisant une structure tertiaire permettant à l'enzyme d'être active.

2.4.3 Sortie de l'ARN

Par quel chemin l'ARN quitte-t-il le site actif et la polymérase ? C'est une question importante car on suppose que les interactions entre l'ARN et la polymérase contribuent à la grande stabilité du complexe d'élongation. Il est supposé [34, 36, 51] que le domaine N-terminal fait des contacts avec ~ 6 bases de l'ARN sortant. Selon Sastry et Ross [51], les contacts ont lieu sur la partie 144-168 du N-terminal. Cependant, cette conclusion est tirée d'une expérience sur des transcrits courts : la polymérase n'est probablement pas encore en phase d'élongation. A partir d'expériences de pontage entre nucléotide et acide aminé sur des complexes d'élongation arrêtés au moins en +15, Temiakov et al. [55] ont proposé une sortie entre le N-terminal et la boucle de reconnaissance spécifique, considération compatible avec les résultats Sastry et Ross. L'expérience de Mukherjee et al. [40] discutée plus haut suggère une sortie par le N-terminal avec des interactions sur ~ 6 bases. L'ARN utiliserait un canal entourés de résidus chargés positivement. Ces considérations sont maintenant confirmées par deux structures du complexe en élongation (cf. ci-dessous).

2.4.4 Addenda

Deux groupes ont récemment proposé une structure du complexe d'élongation de l'ARNPT7 [60, 42]. Ces structures confirment les données déjà obtenues pour la plupart. Elles montrent essentiellement deux points importants : la structure des domaines partagés avec la famille Pol I correspondant à la partie C-terminale de la protéine (la paume, les doigts et le pouce) est

très peu modifiée par rapport à celle du complexe d'initiation (mis à part une région, cf. ci-dessous) ; au contraire, la partie N-terminale subit d'importants changements de conformation (rotation, réarrangement, appariement). Ces changements qui accompagnent le détachement du promoteur permettent la formation d'un hybride ARN :ADN de 7-8 bases et d'un canal de sortie pour l'ARN. Ceci renforcerait entre autres la stabilité du complexe. Parmi les régions qui subissent un changement important se trouve la région 150-200 (conservée chez les phages) appelée "Flap" par Tahirov et al. [60] et sous-domaine H par Yin et Steitz [42] : dans le complexe d'élongation, elle interagit avec l'ARN hybridé, à 5-8 bases de l'extrémité 3' de l'ARN, et forme une partie du canal de sortie de l'ARN.

Dans la partie C-terminale de la molécule, le changement de conformation le plus notable est celui de la boucle de reconnaissance du promoteur ("specificity loop"), qui forme une partie du canal de sortie de l'ARN. Elle pourrait jouer un rôle dans la reconnaissance des sites de pauses ou d'arrêt [60].

Enfin, les deux structures ont été obtenues en l'absence de NTP à incorporer, et ne mettent donc pas en évidence l'état "fermé" déjà observé sur d'autres polymérases de la même famille (cf 2.4.1, *Les doigts*).

Chapitre 3

Description du montage

Certains passages de ce chapitre sont résumés dans l'article de Bockelmann et al. [119].

3.1 Principes de fonctionnement d'un piège optique

Depuis la première utilisation de cette technique en 1970 [114], les pièges optiques ont fait l'objet de nombreuses applications. Ils sont utilisés pour piéger et manipuler des billes diélectriques ou des objets biologiques comme des virus, des bactéries, ou des cellules (références dans [117]). Ils sont aussi utilisés pour appliquer et mesurer des forces jusqu'à une centaine de piconewtons, avec une précision meilleure que le piconewton.

Le principe de base est de créer un gradient de lumière en la focalisant en un point de l'échantillon. Le point de focalisation représente le centre du piège : une micro-bille dont l'indice optique est différent de celui du milieu extérieur est capturée dans ce piège. Le fonctionnement peut être expliqué en terme de conservation de quantité de mouvement du rayon lumineux traversant une interface entre deux milieux d'indices différents. Le principe est illustré sur la figure 3.1, où l'on a représenté uniquement deux rayons incidents focalisés sur une sphère diélectrique.

On distingue dans un premier temps les rayons transmis des rayons réfléchis, en se limitant aux premiers rayons transmis et réfléchis. La trajectoire d'un rayon est déviée à l'interface entre deux milieux d'indices différents. Puisque la quantité de mouvement associée à un rayon lumineux est dirigée dans la direction de propagation de la lumière, et sa norme proportionnelle à l'intensité du rayon, les rayons réfléchis et transmis n'ont pas la même quantité de mouvement totale que celle des rayons incidents. Si la différence, pendant la durée Δt , est notée Δp , alors conformément à la conservation de la quantité de mouvement, la sphère doit subir une force $-\Delta p / \Delta t$.

Dans le premier exemple (figure 3.1), la sphère est placée au dessous du point de focalisation. Dans ce cas, il y a une compétition entre les rayons transmis et les rayons réfléchis qui ne vont pas dans la même direction. Les forces résultantes (respectivement \vec{F}_{trans} et \vec{F}_{ref}) sont opposées. La force totale que subit la bille n'est pas nécessairement dirigée vers le point de focalisation. Il faut pour cela que la quantité de mouvement des rayons transmis puisse contrebalancer celle des rayons réfléchis. On peut voir que la force due aux rayons transmis (\vec{F}_{trans}) augmente avec

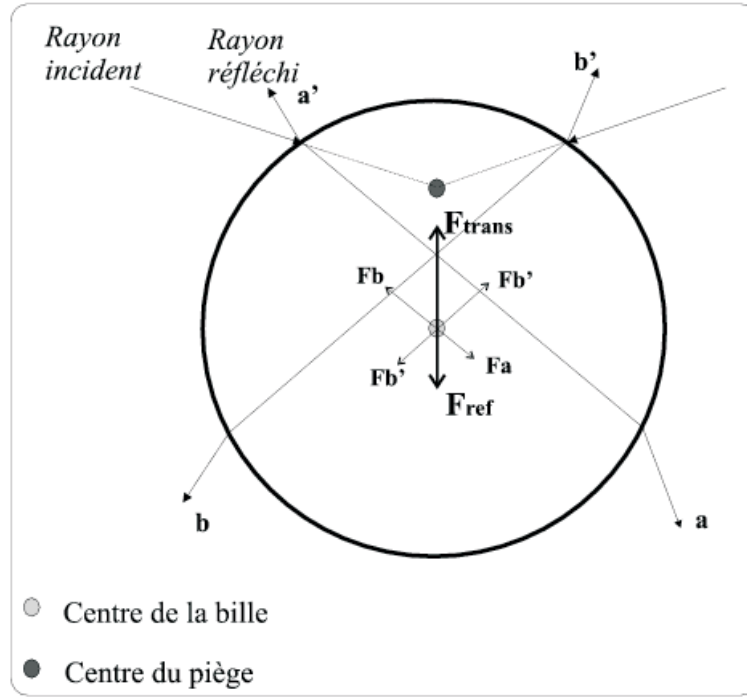


FIG. 3.1 – Forces s'exerçant sur une bille diélectrique, induites par deux rayons focalisés au-dessus du centre de la bille. Les rayons incidents sont en partie réfléchis (rayons a' et b') et en partie transmis (rayons a et b). La variation de quantité de mouvement associée aux rayons incidents est responsable d'une force résultante : $F_{trans} + F_{ref}$. Si l'angle d'incidence est suffisamment élevé la force résultante est dirigée vers le centre du piège (intersection des rayons incidents sans bille).

θ , l'angle formé par le rayon incident et l'axe vertical z ; la force due aux rayons réfléchis (\vec{F}_{ref}) diminue quand θ augmente. Il existe donc une valeur minimum de θ au dessous de laquelle le piège n'est pas stable (i.e. $\|\vec{F}_{ref}\| > \|\vec{F}_{trans}\|$). Cette remarque justifie l'emploi d'un objectif à grande ouverture numérique, et une focale courte (cf partie 3.2.1) pour réaliser la focalisation de la lumière. L'indice de la sphère est aussi un paramètre important. Si l'indice de la sphère n'est pas suffisamment grand par rapport à l'indice du milieu extérieur, les rayons transmis ne sont pas suffisamment déviés à l'interface et le piège n'est pas stable. Le choix de la matière de la sphère n'est donc pas sans conséquence. Pour les expériences qui seront décrites dans ce manuscrit, on utilise des billes de silice.

Dans les deux exemples suivant (figure 3.2), on suppose que les conditions sont réunies pour la stabilité du piège, et on ne représente que les rayons transmis.

Dans le cas d'un placement de la bille au dessus du point de focalisation, la force subit par la bille est encore dirigée vers le point de focalisation. On peut vérifier que dans ce cas, F_{ref} est dans le même sens que F_{trans} , contrairement à l'exemple précédent ; cette observation explique le décalage, dans la direction de propagation, du point d'équilibre de la bille par rapport au

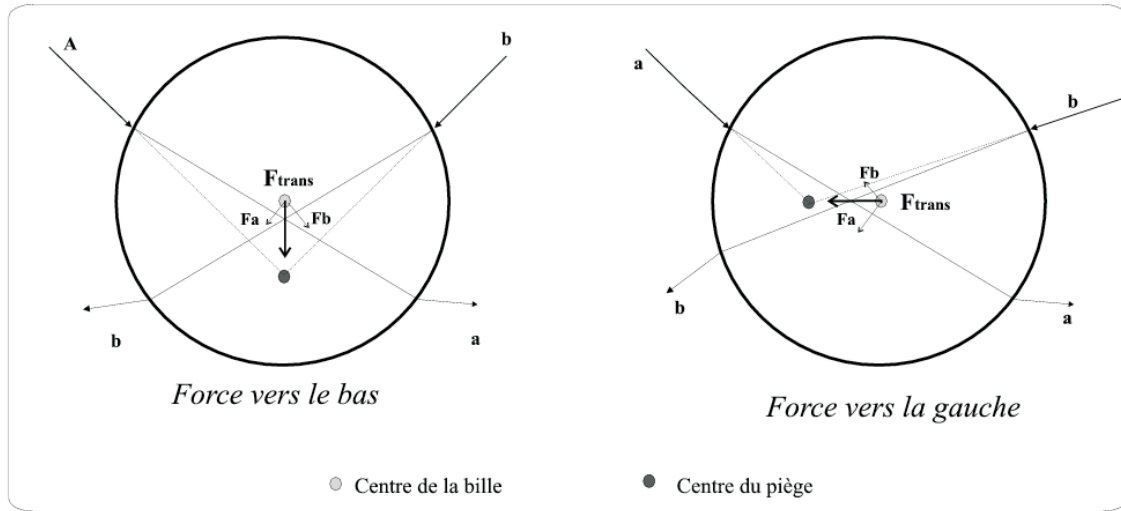


FIG. 3.2 – Les rayons focalisés exercent une force de rappel sur la bille, dans toutes les directions de l'espace. Contrairement à la figure 3.1, les rayons réfléchis ne sont pas représentés ici.

point focal. Le dernier exemple illustre comment le gradient d'intensité lumineuse induit une force de rappel latérale quand la bille se déplace dans le plan xy .

Cette interprétation suppose implicitement que la longueur d'onde λ du faisceau est très petite comparée à la dimension L de la bille, de façon à ignorer les effets de diffraction : A. Ashkin a fourni une explication détaillée de ce mode [115]. Dans la pratique, on utilise un mode avec $L \ll \lambda$, et pour lequel il n'existe pas d'expression analytique de la force exercée par le piège.

Dans la partie suivante est décrit l'appareillage utilisé pour construire un piège optique interférométrique. La réalisation d'un piège proprement dit ne nécessite qu'une partie des éléments présentés ci-dessous, essentiellement le laser, l'optique d'ajustement du faisceau et l'objectif. Pour une description de l'instrumentation utilisée habituellement, on peut se référer à S.P.Smith et al. [117].

3.2 Description du dispositif expérimental et du matériel utilisé

3.2.1 Le piège et la mesure de force

La force agissant sur la bille est déduite par la mesure interférométrique de la position de la bille par rapport au centre du piège.

Sur la figure 3.3 est schématisé le dispositif expérimental. Le laser utilisé est un Néodyme : YAG, à 1064 nm de longueur d'onde (correspondant à un coefficient d'absorption relativement faible dans l'eau [64]). Le laser Yag que nous utilisons a une puissance maximale de 1 Watt.

La lumière issue du laser est polarisée linéairement. Le faisceau traverse un isolateur de Faraday empêchant des retours de faisceau dans la cavité laser (une telle réflexion introduit des fluctuations d'intensité non négligeables par rapport aux précisions demandées pour un tel

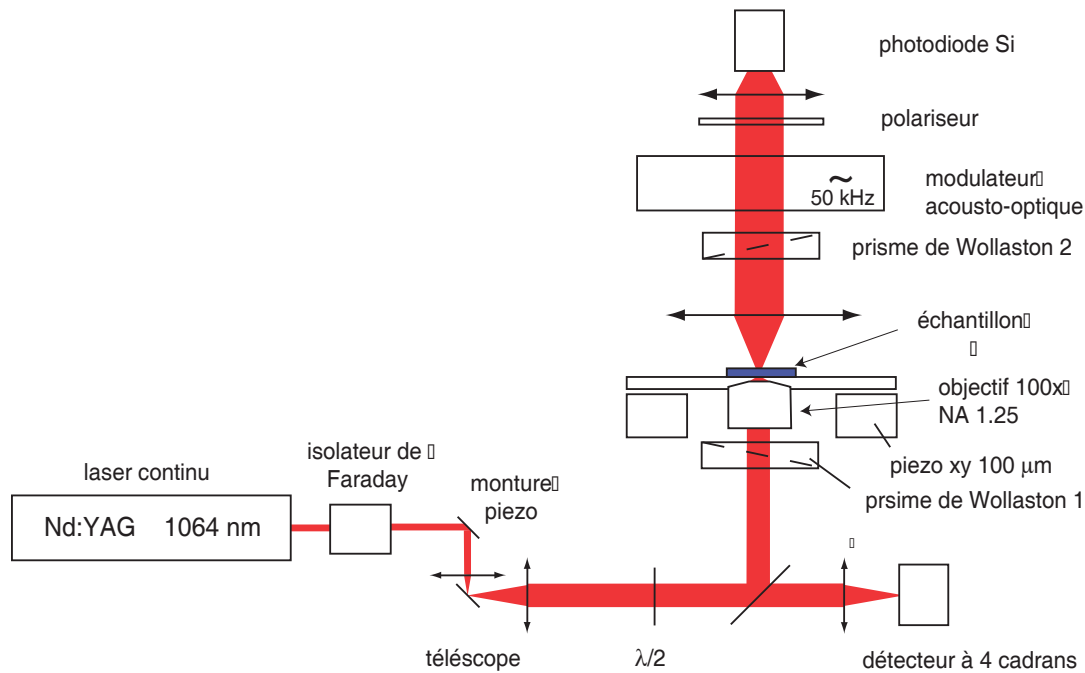


FIG. 3.3 – Schéma du piège optique interférométrique.

montage). Le faisceau passe ensuite par deux miroirs et deux lentilles convexes formant un télescope, et permettant d'ajuster la position et l'angle du faisceau. Une lame $\lambda/2$ induit une rotation de la polarisation ; le champ électrique passe ensuite à travers un prisme de Wollaston avec un angle de 45° par rapport aux axes du prisme. Ce dernier sépare le faisceau incident en deux faisceaux de même intensité, en phase, mais avec des polarisations orthogonales, et avec une faible séparation angulaire α entre eux ; l'objectif (100X, N.A.=1.25, immersion à huile, focale $f=2$ mm) focalise ces deux faisceaux sur l'échantillon en deux points distants de $f\alpha = 200$ nm. Cette distance est petite devant le diamètre des billes utilisées ($1 \mu\text{m}$). Le piège est bien décrit par un potentiel harmonique et une raideur associée k_{piege} , suivant l'axe d'intérêt : l'axe dans le plan de l'échantillon, joignant les deux points de focalisation. Les deux faisceaux traversent l'échantillon : si la bille s'est déplacée par rapport à sa position d'équilibre, le chemin optique des deux faisceaux diffère, entraînant une différence de phase δ entre les deux faisceaux. Les faisceaux sont recombinaés grâce à un second prisme de Wollaston : la différence de chemin optique induit alors une polarisation elliptique de la lumière émergente. Le système de détection consiste à mesurer cette ellipticité par une technique utilisée en ellipsométrie. On utilise un modulateur acousto-optique qui ajoute sur un axe un déphasage $d(t) = a \sin(\omega t)$ ($\omega=50$ kHz). La lumière modulée traverse ensuite un polariseur linéaire, puis son intensité est détectée par une photodiode. La tension électrique de sortie, proportionnelle à l'intensité lumineuse reçue, entre dans une détection synchrone (référence $\omega=50$ kHz). La composante U_ω du signal oscillant à $\omega=50$ kHz, qui est proportionnelle à l'ellipticité de la lumière (cf ci-après), est convertie par un convertisseur analogique-numérique 16-bit, comprenant un filtre anti-repliement ajustable. Le convertisseur utilisé permet des acquisitions à des fréquences de plusieurs kHz. Les données

numériques sont stockées sur le disque dur d'un PC.

Pour décrire ce dispositif théoriquement, on peut utiliser le formalisme de Jones [136]. La matrice de transfert M entre la lumière incidente et sortante est composée par une matrice de rotation de 45° (pour se placer suivant les axes du premier Wollaston); des matrices induisant les phases $\delta(t)$ et $d(t)$ respectivement par l'échantillon et le modulateur acousto-optique; d'une seconde rotation (pour se placer suivant les axes du polariseur); et enfin d'une matrice de polarisation. Elle s'écrit donc :

$$M = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & -1 \\ 1 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} e^{id(t)} & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} e^{i\delta(t)} & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & -1 \\ 1 & 1 \end{pmatrix}$$

Soit :

$$M = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 0 & 0 \\ e^{i(\delta+d)} + 1 & -e^{i(\delta+d)} + 1 \end{pmatrix}$$

Pour une lumière incidente polarisée suivant y , le champs transmis s'écrit :

$$E = I_0^{\frac{1}{2}} M \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \end{pmatrix}$$

L'intensité sortante est alors :

$$EE^* = I_0(1 - \cos(\delta + d))$$

En utilisant les développements en série suivants :

$$\begin{aligned} \cos(a \sin(\omega t)) &= J_0(a) + 2 \sum_{k=1}^{\infty} J_{2k}(a) \cos(2k\omega t) \\ \sin(a \sin(\omega t)) &= 2 \sum_{k=0}^{\infty} J_{2k+1}(a) \sin((2k+1)\omega t), \end{aligned}$$

où les fonctions J_i sont les fonctions de Bessel d'ordre i , et en se limitant aux termes en ω et 2ω , on peut écrire l'intensité sous la forme :

$$EE^* = \frac{I_0}{2}(1 - \cos(\delta)J_0(a)) + I_0J_1(a)\sin(\delta)\sin(\omega t) - I_0J_2(a)\cos(\delta)\cos(2\omega t)$$

Dans la limite de petits déplacements de la bille par rapport au centre du piège, on a, au premier ordre en δ :

$$EE^* = \frac{I_0}{2}(1 - J_0(a)) + I_0J_1(a)\delta\sin(\omega t) - I_0J_2(a)\cos(2\omega t) \quad (3.2.1)$$

On vérifie que l'amplitude du signal oscillant à $\omega=50\text{kHz}$ est bien proportionnelle à δ . L'amplitude a de la modulation est ajustée pour maximiser J_1 .

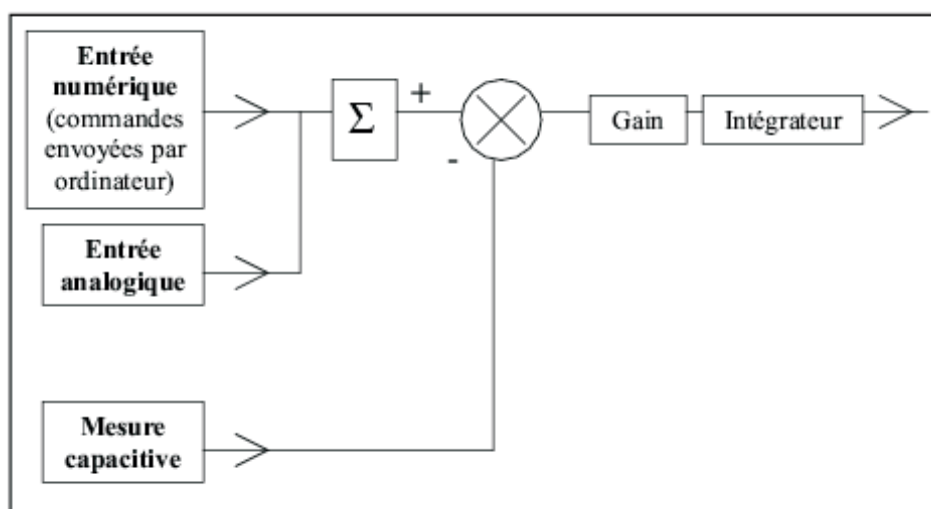


FIG. 3.4 – Module de contrôle pour la mesure et le déplacement des piezos. Les consignes de déplacements sont envoyées aux entrées analogiques et numériques puis sommées. Elles sont ensuite comparées à la mesure capacitive de la position. La différence est ensuite amplifiée puis intégrée pour fournir la tension à imposer pour réaliser le déplacement souhaité.

3.2.2 Autour du piège

Déplacements dans le plan xy .

Pour déplacer finement l'échantillon (plan xy), on utilise des cales piezo-électriques, associées à une mesure capacitive de déplacement, et montées sur un plateau mobile dans le plan xy . Le déplacement fin fonctionne avec une boucle de rétroaction, ce qui permet d'imposer une position avec une précision au nanomètre, sans avoir de soucis de dérive intrinsèque des piezo-électriques. Le déplacement des cales piezo-électriques peut être commandé numériquement par un ordinateur (PC), ou de façon analogique, par une tension choisie (description sur la figure 3.4). La gamme de ce déplacement est limitée à 100 μm .

Le plateau mobile sur lequel sont placées les cales piezo-électriques est commandé par PC, via une manette de jeu (ou "joystick") contrôlant des moteurs de déplacements x et y . Ce système permet des déplacements entre les mesures, rapides (plusieurs centaines de microns par secondes) et sur des distances plus grandes (toute la surface de l'échantillon, soit 10 mm x 10 mm). De plus, l'interface Joystick/PC donne la possibilité d'enregistrer des positions données dans l'échantillon (par exemple aux endroits où l'on a repéré des molécules ancrées à la surface). Une fois ces enregistrements réalisés, on peut revenir aux positions sélectionnées en un temps limité. Ceci est important pour l'étude de la transcription comme on le verra dans la partie 4.2.

Déplacements suivant l'axe z .

Le plateau mobile suivant xy est statique suivant z . C'est l'objectif, et donc le piège qui sont mobiles suivant l'axe z . La position verticale du microscope par rapport à l'échantillon est

mesurée en utilisant une photodiode à deux cadrans, solidaire de l'objectif, et éclairée par une diode laser d'une puissance de l'ordre du mW, et fixe par rapport au montage. Ce dispositif permet de mesurer des déplacements suivant l'axe z avec une précision de l'ordre de la dizaine de nanomètres.

Perturbations lors de l'expérience.

Pour réduire au maximum les perturbations mécaniques, nous utilisons une table optique qui isole des vibrations du sol, ainsi qu'un dispositif protégeant le montage des courants d'air. Pour supprimer les fluctuations résiduelles latérales du faisceau pointant sur l'échantillon, une boucle de rétroaction a été mise en place pour réguler l'angle du laser, incluant un miroir piezo-électrique et une photodiode à quatre cadrans sur le trajet du faisceau. Le déplacement relatif faisceau/échantillon est ainsi réduit à ~ 10 nm/min.

Pendant le déroulement d'une expérience, il n'est pas souhaitable que le piège soit actif en permanence, car il peut attirer tous les corps alentours (billes libres, etc...) perturbant ainsi la mesure. L'utilisation d'un obturateur placé sur le trajet du faisceau est cependant proscrit car elle ne permet pas de stabiliser thermiquement l'objectif. En effet, lorsque l'obturateur est ouvert, les lentilles chauffent légèrement, ce qui fait varier la focale de l'objectif, entraînant une baisse de la position du piège par rapport à l'échantillon (travail effectué par Alexandre Dawid). L'effet est d'autant plus gênant qu'il intervient au tout début de la mesure, au moment où la bille sélectionnée est piégée. Pendant la première minute suivant l'ouverture de l'obturateur, la baisse du piège optique est de l'ordre de ~ 400 nm. Afin d'obtenir l'équilibre thermique de l'objectif, nous avons eu recours à l'astuce suivante : nous avons placé sur le trajet du faisceau une lentille de type ménisque, de très longue focale (800 mm) qui perturbe peu la forme du faisceau, mais qui est cependant susceptible d'induire des aberrations sphériques, et donc une moins bonne focalisation du laser. Cette lentille est reliée à un moteur qui l'introduit sur le trajet du faisceau (hors mesure) ou l'en retire (pendant la mesure) : lorsque la lentille est introduite sur le trajet, le faisceau focalisé sur l'échantillon attire les objets dans le plan xy , mais les rejette suivant l'axe z .

Régulation de la température.

Il est nécessaire, pour les expériences de transcription, de maintenir une température constante, car l'activité de l'ARNPT7 est sensible à la température. Des résistances chauffantes ont été installées sur l'objectif et contre le plateau, i.e. les deux parties du montage en contact avec l'échantillon pendant l'expérience. On utilise un contrôleur électronique (RHM-4000, Wavelength electronics) qui permet de réguler la température au dixième de degré près.

Régulation pour maintenir une force constante au cours d'une expérience.

La figure 3.5 montre schématiquement comment une force est exercée par une construction moléculaire ancrée entre une surface et une bille maintenue dans le piège. Le piège étant fixe, la force est contrôlée par la distance entre les deux points d'ancrage. Si par exemple la construction

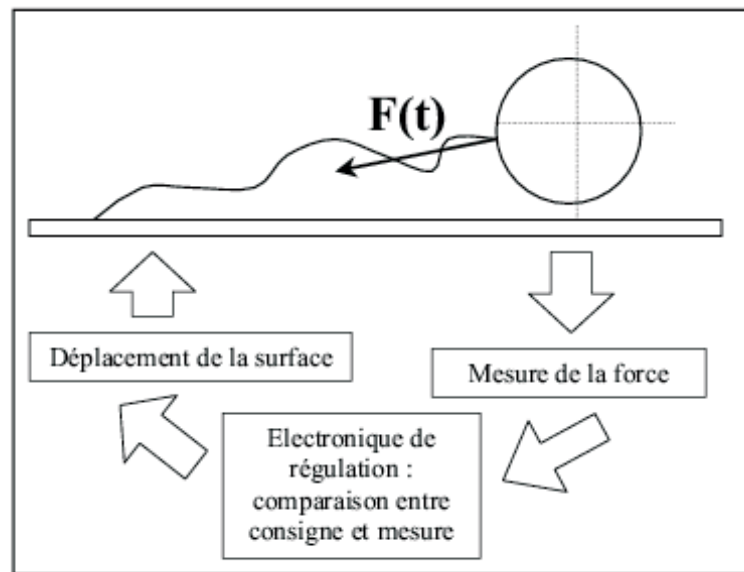


FIG. 3.5 – Schématisation de la rétroaction permettant de maintenir une force constante. La sphère représente la bille dans le piège. On suppose que la construction (symbolisée par la ligne courbe) exerce une force sur la bille qui varie en fonction du temps si le piège et la surface restent fixes. La force est mesurée par le décalage de la bille par rapport au centre du piège. Cette mesure est envoyée vers un montage électronique (dont le principe de fonctionnement est décrit sur la figure 3.6) : si le signal de force diffère de la consigne choisie, il en sort une commande de déplacement de la surface qui va tendre ou détendre la construction pour maintenir une force constante.

se raccourcit au cours du temps¹, la force exercée sur la bille va augmenter au cours du temps si le piège et la surface restent immobiles. Si l'on veut maintenir une force constante, il faut déplacer la surface, de façon à rapprocher les deux points d'ancrage. Sur la figure 3.5 est schématisé comment ce contrôle est possible : la mesure de force est utilisée pour être comparée à une consigne (la force que l'on veut maintenir) ; la surface est déplacée suivant l'écart entre mesure et consigne. Sur la figure 3.6 est schématisé le principe de fonctionnement de la régulation électronique utilisée : la différence entre mesure et consigne est intégrée puis envoyée à l'entrée analogique du module de contrôle du déplacement des piezos.

Une constante de temps τ est associée à la régulation, définie par le produit $\tau = RC$, où R et C sont respectivement la résistance et la capacité de l'étage intégrateur de la régulation. Dans les expériences, les valeurs sont de ~ 5 à ~ 100 k Ω pour R et 220 nF pour C , soit : $\tau \sim 1$ -20 ms.

¹C'est la cas de l'expérience de transcription, dont on détaille la configuration dans la partie 4.1.2.

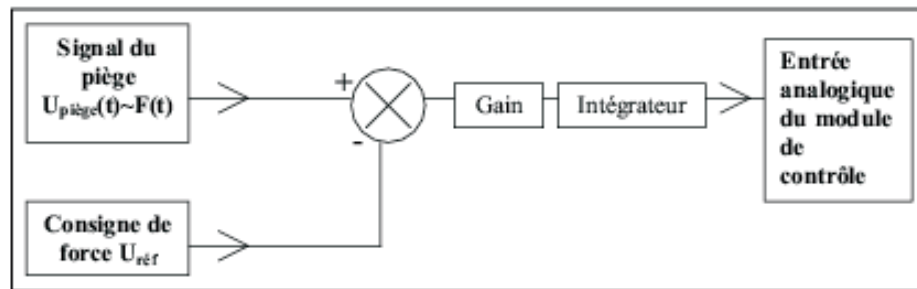


FIG. 3.6 – Principe de la rétroaction commandant le déplacement de la surface pour maintenir une force constante. Le signal provenant du piège est une tension $U_{piege}(t)$ proportionnelle à la force exercée sur la bille. La différence entre la consigne et la mesure $U_{ref} - U_{piege}(t)$ est amplifiée, intégrée, puis envoyée à l'entrée analogique du module de contrôle du déplacement des piezo-électriques. La constante de régulation τ est contrôlée par la résistance R et la capacité C du condensateur de l'intégrateur : $\tau = RC$.

3.3 Calibration du piège

Le diamètre de $1\ \mu\text{m}$ des billes est de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde du laser et ne permet donc pas d'utiliser la théorie électromagnétique, ni la théorie géométrique pour calculer la force exercée par la lumière sur la bille [64]. Un calcul numérique est possible, mais il ne prendrait pas en compte l'imperfection des composants optiques. La calibration expérimentale est donc nécessaire.

Pour calibrer le piège, nous avons étudié trois méthodes, chacune présentant avantages et défauts spécifiques. La première méthode (bille dans un gel) permet uniquement de déterminer dans quelle gamme le signal de sortie de l'interféromètre est proportionnelle au déplacement de la bille. La seconde méthode (bille dans un liquide oscillant) permet de déterminer le facteur reliant la tension de sortie de la détection synchrone à la force. La dernière méthode (analyse du mouvement brownien d'une bille piégée) permet aussi de trouver ce facteur, ainsi que la raideur du piège.

3.3.1 Bille dans un gel

On utilise dans cette expérience un gel de polyacrylamide suffisamment dense pour immobiliser les billes. Le principe consiste à mesurer la réponse de la détection en fonction de la position de la bille par rapport au point de focalisation.

On place l'échantillon de telle manière qu'une bille soit au centre du piège ; on fait ensuite osciller l'échantillon à travers le spot de focalisation laser avec une amplitude assez large pour couvrir complètement le domaine de détection, et on mesure U_ω (*i.e.* la tension proportionnelle à la force, cf 3.2.1) en fonction du déplacement Y imposé de l'échantillon. On obtient une courbe caractéristique en S (figure 3.7). Cette courbe indique qu'il existe bien un domaine où la sortie de la détection synchrone U_ω est proportionnelle au déplacement de la bille. Sur la figure 3.7,

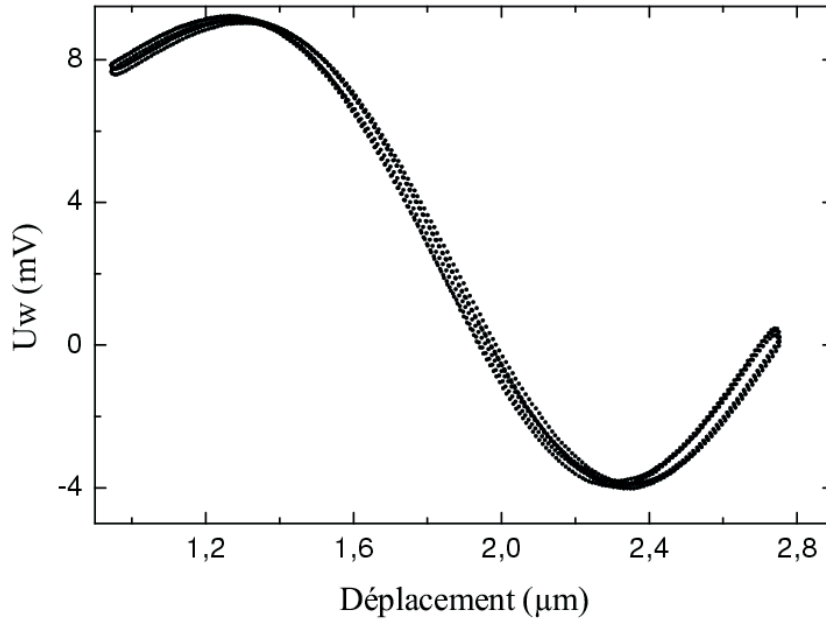


FIG. 3.7 – Signal U_w , en fonction du déplacement relatif de la bille dans le gel. Le centre du piège correspond à un déplacement de $1,8 \mu\text{m}$. Pour cette position, on devrait obtenir $U_w = 0$; l'écart met en évidence la difficulté à régler exactement le Wollaston, dont le déplacement permet d'équilibrer l'interféromètre. L'expérience indique le domaine dans lequel le signal mesuré U_w est proportionnel au déplacement de la bille ; ici $\pm 200 \text{ nm}$ dans le plan horizontal (xOy). Le couplage faible entre les déplacements en x et en y introduit une légère hystérésis dans le signal.

l'amplitude totale du domaine est d'environ 400 nm .

3.3.2 Bille dans un liquide oscillant

Le principe de l'expérience consiste à capturer une bille dans le piège, et à faire osciller l'échantillon qui entraîne le fluide. On mesure la réponse de la bille soumise à la friction du fluide. Cette calibration est facilitée par la faible valeur du nombre de Reynolds :

$$Re = \frac{va\rho}{\eta} \sim 10^{-5}$$

où v est la vitesse du fluide, ρ , la masse volumique de l'eau, a la dimension de la bille et η la viscosité de l'eau. Les forces inertielles sont alors négligeables. L'amplitude $|X_b(t)|$ du mouvement de la bille est alors² :

²Si l'on néglige de plus la force aléatoire responsable du mouvement Brownien de la bille, on obtient une équation simple du mouvement de la bille :

$$kX_b + \gamma\left(\frac{dX_b}{dt} - \frac{dX_e}{dt}\right) = 0 \quad (3.3.1)$$

où l'on considère le centre du piège comme origine. X_b est la position de la bille, k la raideur du piège, γ le coefficient de friction de l'eau, et X_e la position du fluide (supposé entraîné en bloc par la lamelle de l'échantillon).

$$|X_b(t)| \simeq \Omega\tau X_0 \quad (3.3.4)$$

où l'on a posé : $\tau = \gamma/k$; k est la raideur du piège, γ le coefficient de friction de l'eau ; X_0 est l'amplitude de l'oscillation imposée et Ω sa pulsation. On ne connaît pas la raideur du piège, mais on peut estimer son ordre de grandeur ($k \approx$ une centaine de pN par μm ; on pourra le vérifier par la suite) ; connaissant la viscosité de l'eau, on en déduit un ordre de grandeur de τ :

$$\tau \approx 10^{-4} \text{ s}$$

Le régime $\Omega\tau \ll 1$ correspond donc à des fréquences inférieures à 10 kHz. En se plaçant dans ce régime, on effectue, pour une intensité du laser donnée, deux séries de mesures :

- mesure de U_ω en fonction de l'amplitude X_0 imposée de l'échantillon, à Ω fixée,
- mesure de U_ω en fonction de la fréquence $\Omega/2\pi$ du déplacement imposé, à X_0 fixé.

D'après l'équation (3.3.4), on s'attend à trouver une droite dans chaque cas. Des résultats sont présentés sur les figures 3.8 et 3.9, illustrant les deux cas de figure. Pour la série en amplitude, l'expérience a été menée sur trois billes différentes. On remarque que pour chaque bille, la linéarité attendue est bien observée, mais que les pentes diffèrent de bille à bille. Ce résultat a été confirmé sur la calibration de 64 billes différentes donnant une variation du facteur de $\pm 10\%$ autour de la valeur moyenne.

Si l'on impose un déplacement sinusoïdal de l'échantillon, et si l'on fait l'hypothèse que le fluide suit parfaitement la trajectoire imposée (les écoulements provoqués par l'oscillation de l'échantillon sont supprimés en collant la lamelle ronde supérieure de l'échantillon sur l'anneau formant le puit), le mouvement de l'eau peut se mettre sous la forme complexe :

$$X_e = X_0 e^{i\Omega t} \quad (3.3.2)$$

où X_0 est l'amplitude (réelle) de l'oscillation et Ω la pulsation imposée. Le déplacement du fluide est la partie réelle de X_e :

$$X_0 \cos(\Omega t)$$

On s'attend donc à une réponse de la bille de la forme :

$$X_b = A e^{i\Omega t} \quad (3.3.3)$$

où A est un nombre complexe. Les équations (3.3.1), (3.3.2), (3.3.3) donnent :

$$A + i\Omega\tau(A - X_0) = 0$$

où l'on a posé :

$$\tau = \frac{\gamma}{k}$$

τ a la dimension d'un temps. On établit alors :

$$X_b(t) = \frac{\Omega\tau X_0}{\sqrt{1 + \Omega^2\tau^2}} e^{i(\Omega t + \frac{\pi}{2} - \varphi)}$$

où $\varphi = \arctg(\Omega\tau)$. Dans le régime : $\Omega\tau \ll 1$, le mouvement de la bille est en quadrature par rapport au mouvement imposé :

$$X_b(t) \simeq \Omega\tau X_0 e^{i(\Omega t + \frac{\pi}{2})}$$

L'amplitude du mouvement de la bille est bien :

$$|X_b(t)| \simeq \Omega\tau X_0$$

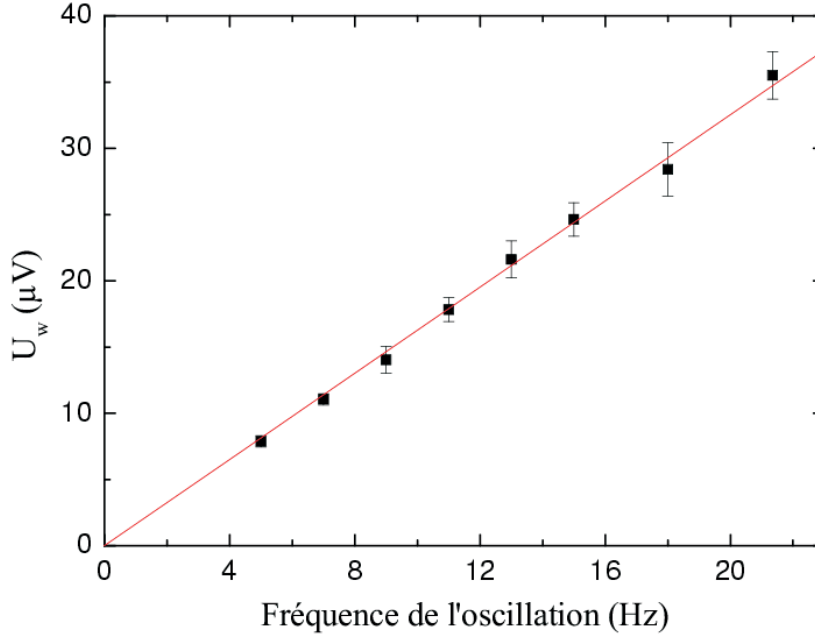


FIG. 3.8 – Mesure de U_ω , en fonction de la fréquence de l'oscillation de l'échantillon. La puissance du laser est ~ 15 mW et l'amplitude de l'oscillation est ~ 75 nm.

Cette méthode ne nous donne pas la raideur du piège mais uniquement la constante K (pN/V) reliant la tension de sortie de la détection synchrone à la force :

$$F = KU_\omega$$

Autrement dit, pour connaître la force, seule la connaissance de U_ω importe, car le facteur K est constant, quelque soit la puissance du laser.

Sur la figure 3.10, on constate le retard de $\pi/2$ du déplacement de la bille par rapport à l'oscillation imposée.

3.3.3 Analyse du mouvement brownien d'une bille piégée

On utilise ici le mouvement brownien de la bille capturée dans le piège pour établir la calibration.

Une équation approchée du mouvement de la bille dans le piège optique est l'équation de Langevin :

$$\gamma \frac{dX}{dt} + kX = F(t) \quad (3.3.5)$$

où γ est le coefficient de friction de l'eau donnée par la loi de Stokes : $\gamma = 6\pi\eta a$ avec a le rayon de la bille ; k est la raideur du piège, et $F(t)$ la force aléatoire associée au bombardement des particules d'eau sur la bille, responsable du mouvement brownien de celle-ci. Cette force est en moyenne nulle, et son spectre en puissance $S_F(f)$ est constant, c'est-à-dire qu'il représente un

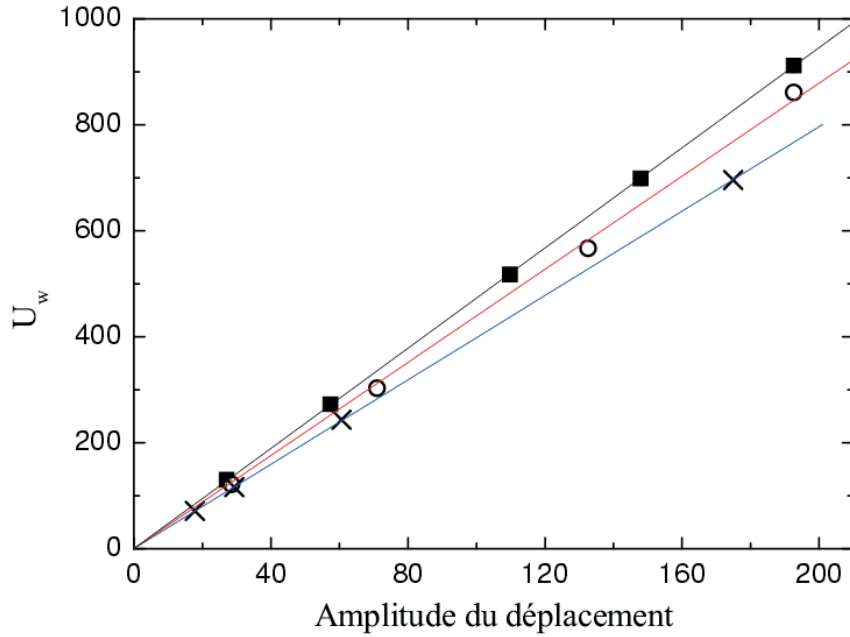


FIG. 3.9 – Mesure de U_w , en fonction de l'amplitude de l'oscillation de l'échantillon, sur trois billes différentes (chacun des trois symboles correspond à une bille). La puissance du laser est ~ 20 mW, la fréquence de l'oscillation est 20 Hz. Ce sont les différences bille à bille et non pas la méthode utilisée, qui limitent la précision de la calibration.

bruit blanc idéal :

$$\|\tilde{F}(\omega)\|^2 = S_F(f) = 4\gamma k_b T$$

où k_b et T désignent respectivement la constante de Boltzman et la température, et $\tilde{F}(\omega)$ la transformée de Fourier de $F(t)$. En prenant les modules au carré des transformées de Fourier de chaque membre de l'équation 3.3.5, on déduit la densité spectrale du mouvement [118] :

$$S_x(f) = \frac{k_b T}{\gamma \pi^2 (f_c^2 + f^2)} \quad (3.3.6)$$

où l'on a posé :

$$f_c = \frac{k}{2\pi\gamma} \quad (3.3.7)$$

f_c est appelée la fréquence de coupure. L'équation 3.3.6 montre comment les fluctuations sont distribuées suivant les fréquences. On distingue :

-un régime basses fréquences, $f \ll f_c$, dans lequel la densité spectrale est constante :

$$S_x(f \ll f_c) \sim \frac{4\gamma k_b T}{k^2},$$

qui traduit le confinement de la particule,

-un régime hautes fréquences ($f \gg f_c$) dans lequel $S_x(f)$ décroît en $1/f^2$, caractéristique de la diffusion libre.

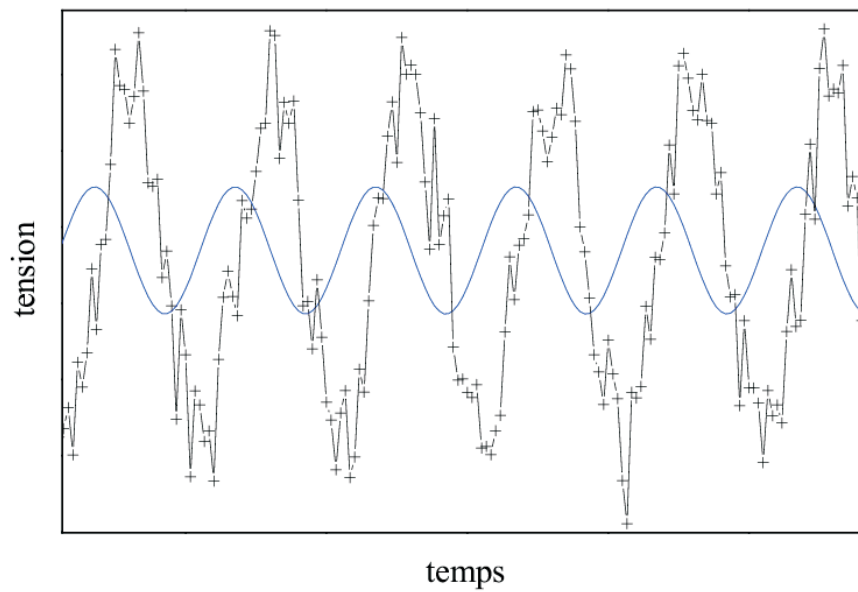


FIG. 3.10 – Les deux courbes représentent l'amplitude de la tension U_ω (courbe accidentée) et la mesure capacitive du déplacement des piezos (courbe lisse), en fonction du temps ; on compare donc le déplacement de la bille au déplacement de l'échantillon. On vérifie ici le retard de $\pi/2$ de la bille, caractéristique du régime $\Omega\tau \ll 1$. Les écarts des mesures de U_ω par rapport à la sinusoïde théorique sont dus aux "basses" fréquences du bruit brownien non filtrées. La mesure du signal à ω s'effectue par une première détection synchrone ; une seconde détection mesure ensuite l'amplitude de ce signal (proportionnel au déplacement de la bille dans le piège), qui oscille à la fréquence Ω .

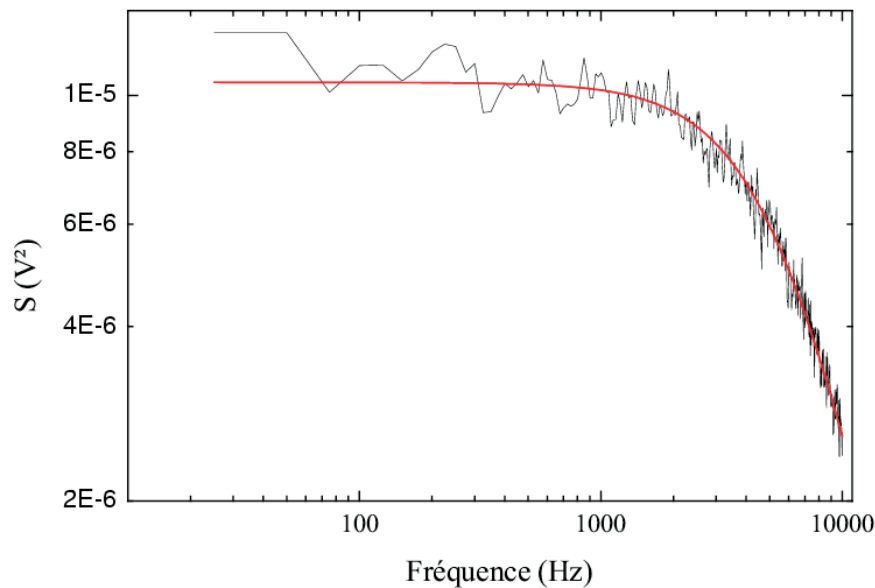


FIG. 3.11 – Densité spectrale (reliée à $\langle U_\omega^2 \rangle$) mesurée par l'analyseur de spectre, pour une puissance de ~ 700 mW. L'ajustement de la courbe expérimentale par une lorentzienne (courbe lisse) donne la fréquence de coupure f_c (ici : 5700 Hz) et l'aire sous la courbe A (ici : 4,7 mV^2/s).

En utilisant un analyseur de spectre, on mesure la densité de puissance spectrale d'une bille piégée et soumise au mouvement Brownien. Les données enregistrées sont ensuite analysées à l'aide d'un logiciel d'analyse graphique (Origin).

Sur la figure 3.11 est présenté un spectre enregistré pour une puissance du laser de ~ 700 mW.

Cette méthode permet d'accéder au facteur K reliant la force et la tension de sortie de la détection synchrone, ainsi que la raideur du piège. L'ajustement de la courbe expérimentale par une lorentzienne permet de déterminer deux paramètres : la fréquence de coupure f_c et l'aire totale sous la courbe, notée A . Ces deux paramètres sont proportionnels à la puissance du laser, comme on peut le voir sur la figure 3.12.

La raideur du piège est déduite de f_c (cf équation (3.3.7)), et le facteur K , indépendant de la puissance du laser, s'exprime en fonction du rapport entre f_c et A . On montre en effet qu'en égalant l'équation 3.3.6 et l'équation ajustée d'après par le spectre expérimental, on obtient l'expression de la force sous la forme suivante :

$$F = U_\omega \sqrt{2\pi\gamma k_B T \frac{f_c}{A}}$$

3.3.4 Conclusion sur les trois méthodes de calibration

La méthode par le gel reste la moins efficace. D'une part, il est difficile de déterminer dans quelle mesure le gel modifie l'indice par rapport à l'eau. Ensuite, les mesures sont effectuées sur

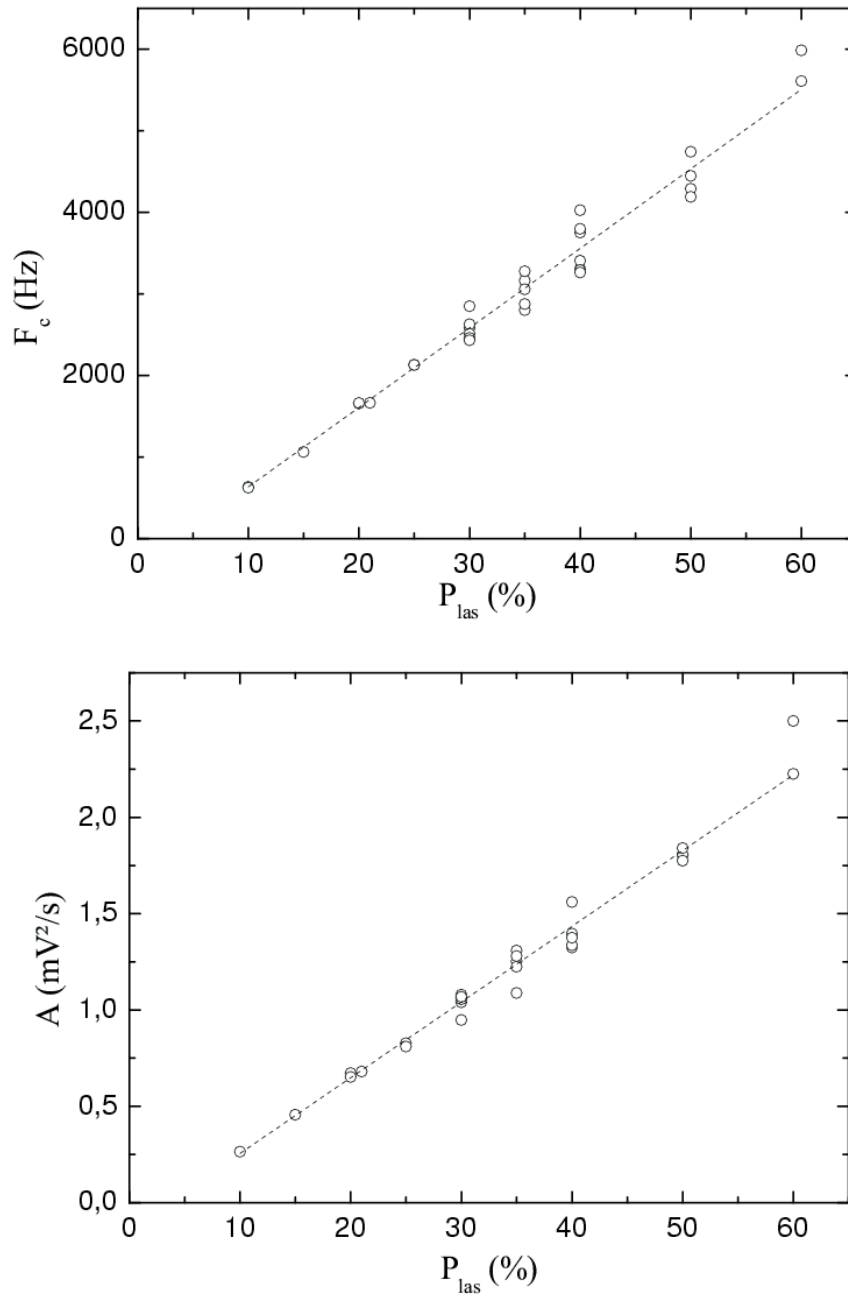


FIG. 3.12 – On porte f_c , la fréquence de coupure et A , l'aire totale sous la spectre, les deux paramètres donnés par l'ajustement des données expérimentales par une lorentzienne, en fonction de la puissance. Les droites en pointillés sont le résultat de régressions linéaires.

des billes loin de la surface, les caractéristiques du piège n'étant alors pas les mêmes que celle de l'expérience. Enfin, il est difficile de placer la bille au centre du piège. Le principal intérêt (sinon le seul) de cette méthode est de d'évaluer le domaine de déplacement dans lequel le piège est "linéaire" ; c'est-à-dire ici jusqu'à environ 400 nm du point focal.

La deuxième méthode donne directement le facteur reliant la tension de sortie de la détection synchrone à la force, qui est indépendant de la puissance du laser. L'étude par variation de l'amplitude, à fréquence d'oscillation constante est facile à mettre en oeuvre, et les résultats obtenus sont très satisfaisants (bonne linéarité).

La dernière méthode donne en plus la raideur du piège, mais ce n'est pas un facteur décisif pour obtenir la force. Elle est aussi précise que la deuxième méthode, sauf à haute puissance laser (à partir de 600 mW), où des non linéarités apparaissent pour la fréquence de coupure et le facteur A . Elle est par contre plus rapide.

Les deux dernières méthodes donnent des facteurs qui diffèrent de $\sim 10\%$. On rappelle qu'une variation du signal du même ordre, de bille à bille a aussi été observée (cf deuxième méthode).

On trouve une valeur du facteur K reliant la tension $U\omega$ sortant du piège et la force : $K=1.1$ pN/V. Cette valeur est déterminée d'après la calibration par analyse spectrale.

3.4 Dépendance en z du signal

La figure 3.13 représente schématiquement la configuration dans laquelle toutes les expériences se déroulent. Cette configuration est responsable de deux effets : (i) la proximité de la surface modifie le coefficient de friction de l'eau, (ii) le déplacement Y mesuré de la surface par rapport au piège ne correspond pas exactement à l'extension réelle Ex de la construction.

(i) La proximité de la surface est prise en compte dans la friction par une correction apportée à la formule de Stokes [64] :

$$\gamma = \frac{6\pi\eta a}{[1 - \frac{9}{16}(a/H) + \frac{1}{8}(a/H)^3 - \frac{45}{256}(a/H)^4 - \frac{1}{16}(a/H)^5]} \quad (3.4.1)$$

où H est la position de la bille par rapport à la surface, et a le rayon de la bille. Pour illustrer cet effet, on effectue la mesure de l'amplitude d'oscillation d'une bille piégée dans le liquide oscillant (cf deuxième méthode de calibration), à différentes distances de la surface (figure 3.14). L'effet est important quand la distance à la surface est proche de la dimension de l'objet considéré (ici les billes de $1 \mu\text{m}$ de diamètre). En pratique, on néglige l'effet de proximité de la surface sur le coefficient de friction en se plaçant entre 3 et $6 \mu\text{m}$ de la surface.

(ii) Pour connaître l'étirement de la construction, il faut connaître la distance du piège à la surface. Comme on l'a expliqué au 3.2.2, les variations de position du piège suivant l'axe z peuvent être mesurées. Mais la position absolue est a priori inconnue. Une méthode empirique simple nous permet d'estimer la position de la surface ; elle consiste à abaisser vers la surface le piège tenant une bille. Le signal présenté sur la figure 3.15 montre la variation caractéristique observée à l'approche de la surface. L'hystérésis obtenue lorsque la bille se colle à la surface montre que la séparation des chemins doit correspondre approximativement à la position de la surface.

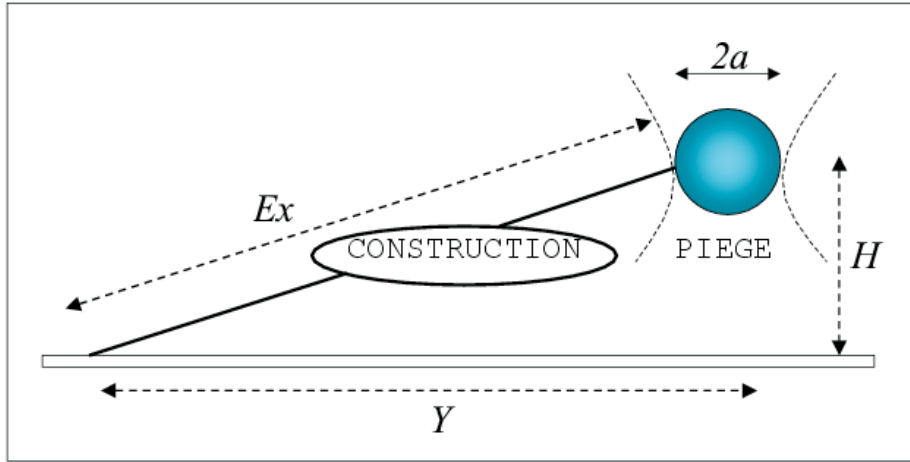


FIG. 3.13 – Configuration générale d'une expérience : une construction adaptée est ancrée à la surface par un bout et à une bille par l'autre bout. La bille est maintenue dans le piège, la surface est mobile. On applique une force en écartant les deux points d'ancrage. Ex désigne l'extension de la construction, qui ne coïncide pas exactement avec la distance Y , un paramètre mesuré pendant l'expérience. On déduit Ex à partir de Y , de la hauteur H du piège par rapport à la surface, et de la dimension de la bille (rayon a).

L'extension Ex de la construction est alors déduite de H , Y et a le rayon de la bille :

$$Ex = \sqrt{Y^2 + H^2} - a \quad (3.4.2)$$

On néglige donc les déplacements de la bille dans le piège suivant z et suivant xy , ce qui change sensiblement les valeurs de H et Y . Ces déplacements de l'ordre de la dizaine de nm sont jugés négligeables devant H et Y , de l'ordre de 5 et 10-15 μm respectivement.

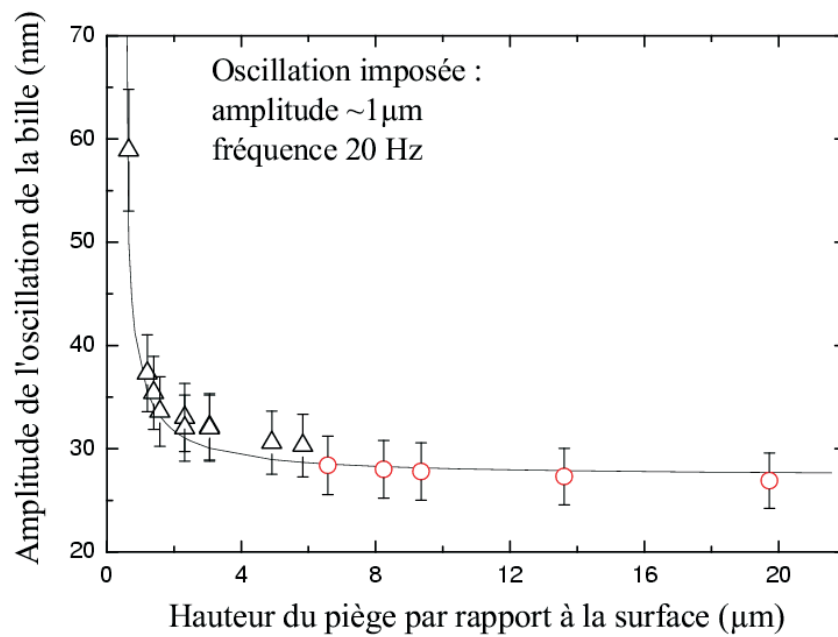


FIG. 3.14 – Effet de proximité de la surface sur la friction de l'eau exercée sur les billes. On représente l'amplitude du mouvement d'une bille piégée lors de l'oscillation imposée de l'échantillon (cf méthode de calibration) en fonction de la hauteur du piège par rapport à la surface. Les barres d'erreur sont systématiquement imposées à $\pm 10\%$, conformément à la variation observée de bille à bille (cf méthode de calibration).

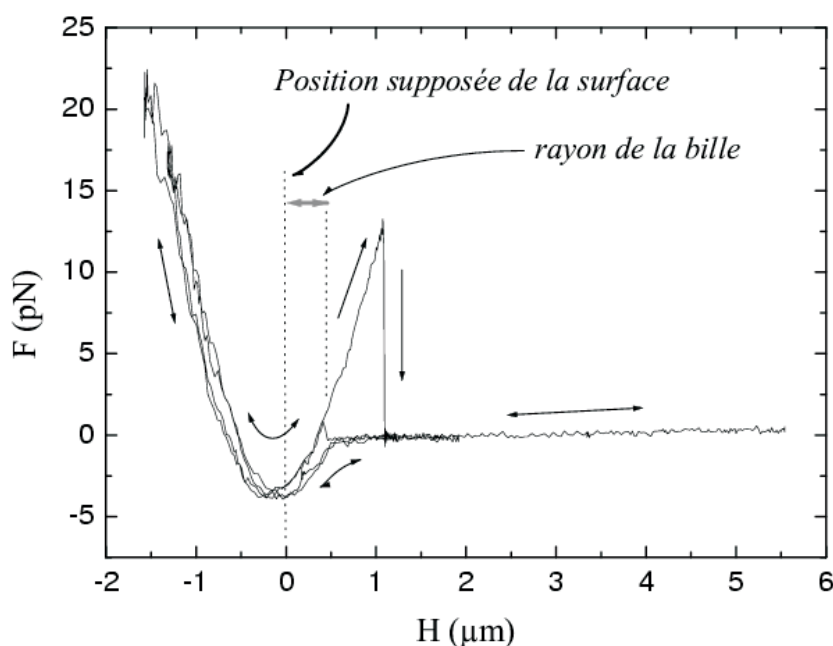


FIG. 3.15 – Signal de force en fonction de la hauteur H du centre du piège par rapport à la surface, quand une bille libre est maintenue dans le piège. Tant que la bille n'est pas en contact avec la surface ($H > 0.5 \mu\text{m}$), le signal de force est proche de zéro (la bille n'est soumise qu'à la force de rappel du piège). Quand la bille de rayon $0.5 \mu\text{m}$ touche la surface (pour $H = 0.5 \mu\text{m}$) le signal est modifié. L'interférence qui en résulte se caractérise par un signal en forme de parabole. Les flèches indiquent si le signal est observable à la montée et/ou à la descente du piège. Une hystérésis apparaît parfois, elle est probablement due au collage temporaire de la bille à la surface lors de la remontée du piège. L'axe des abscisses a été translaté pour que $H = 0$ corresponde à la position supposée de la surface.

Chapitre 4

Mise en place d'une expérience

4.1 Description générale

4.1.1 Echantillon et constructions moléculaires

L'échantillon.

L'échantillon dans lequel les expériences sont réalisées est schématisé sur la figure 4.1. Il consiste en une lamelle de verre (22 mm x 22 mm) sur laquelle un anneau de ~ 15 mm de diamètre est collé avec de la paraffine. L'ensemble constitue ce que l'on nomme un "puits". Un traitement chimique adapté des surfaces permet d'y accrocher de façon covalente des polymères sur lesquels on arrive ensuite à ancrer les protéines souhaitées (streptavidine ou antidigoxygénine ; pour les détails de la préparation, cf [119]). Les expériences se déroulent en milieu aqueux, le puits est rempli du tampon adéquat (100 à 200 μ l), puis recouvert d'une lamelle ronde en verre qui permet d'obtenir une bonne transmission de la lumière à travers l'échantillon. Cet échantillon sera ensuite posé sur l'objectif d'un microscope inversé.

Les surfaces traitées peuvent être conservées sous atmosphère humide à 4°C, et utilisables plusieurs fois suivant le type d'expérience.

Les constructions moléculaires

Pour les expériences de transcription, la construction moléculaire est préparée à partir de l'ADN du bactériophage Lambda (ADN λ) et d'oligonucléotides particuliers. La construction moléculaire utilisée pour les expériences d'ouverture de la double hélice est élaborée à partir de l'ADN λ et du plasmide pTYB1. Les principes des deux constructions sont schématisés sur la figure 4.2 (les détails des constructions sont donnés en annexe 9.4 concernant la construction de transcription, et dans [119] concernant la construction d'ouverture). Les constructions ont toutes un point commun : une extrémité de la construction porte un groupe chimique permettant de la lier à une bille, l'autre extrémité porte un groupement pour la lier à la surface (cf annexe 9.5). Pour l'étude de la transcription, la construction est attachée à la surface via une polymérase biotinyllée.

Les billes de silice d'un micromètre de diamètre sont aussi traitées pour porter une espèce

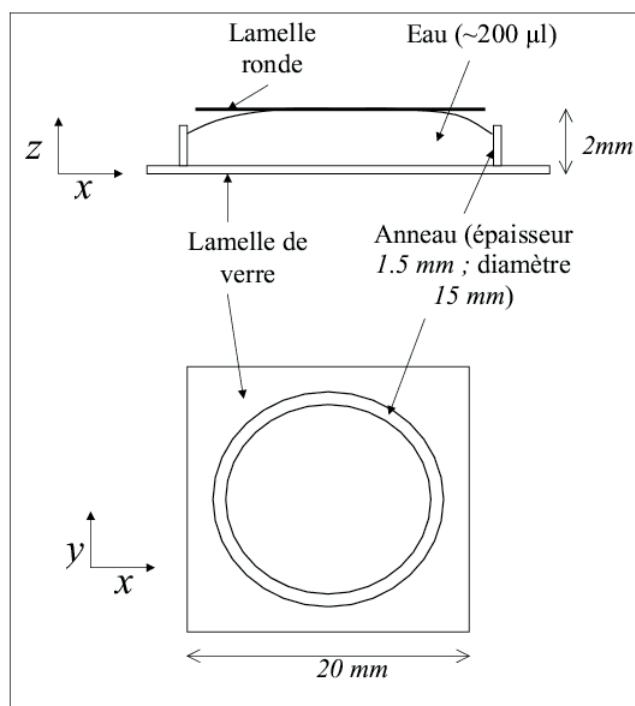


FIG. 4.1 – Représentation schématique du "puits", l'échantillon dans lequel a lieu l'expérience.

chimique spécifique. Les deux attachements utilisés sont : digoxygénine- antidigoxygénine, et biotine- streptavidine. On utilise l'un ou l'autre pour l'attachement surface- construction ou l'attachement construction-bille.

4.1.2 L'expérience

Préparation de l'expérience

Dans un premier temps est abordé un problème spécifique à l'expérience de transcription.

Purification

Comme on l'a vu dans la partie 2.2.3, le complexe ADN-protéine lors de la phase d'initiation est peu stable. La réaction d'initiation nécessite une grande concentration d'enzymes et de nucléotides. Pour cela, on effectue le mélange ADN-polymérase en petit volume ($\approx 5 \mu\text{l}$), avant de le déposer sur la surface de l'échantillon. Il reste cependant un grand nombre de polymérases libres qui ne se sont pas associées à un ADN. Dans le puits, ces polymérases libres vont occuper les sites streptavidine disponibles sur la surface de l'échantillon (les polymérase libres ont plus de facilité que les constructions entières polymérase-ADN-bille à trouver les sites, car elles sont plus légères et diffusent donc plus rapidement). La présence en grand nombre des polymérases libres limite donc la probabilité d'observer la réaction favorable : complexe ADN-polymérase attaché à la surface et à une bille. Une autre molécule est également en compétition pour l'occupation

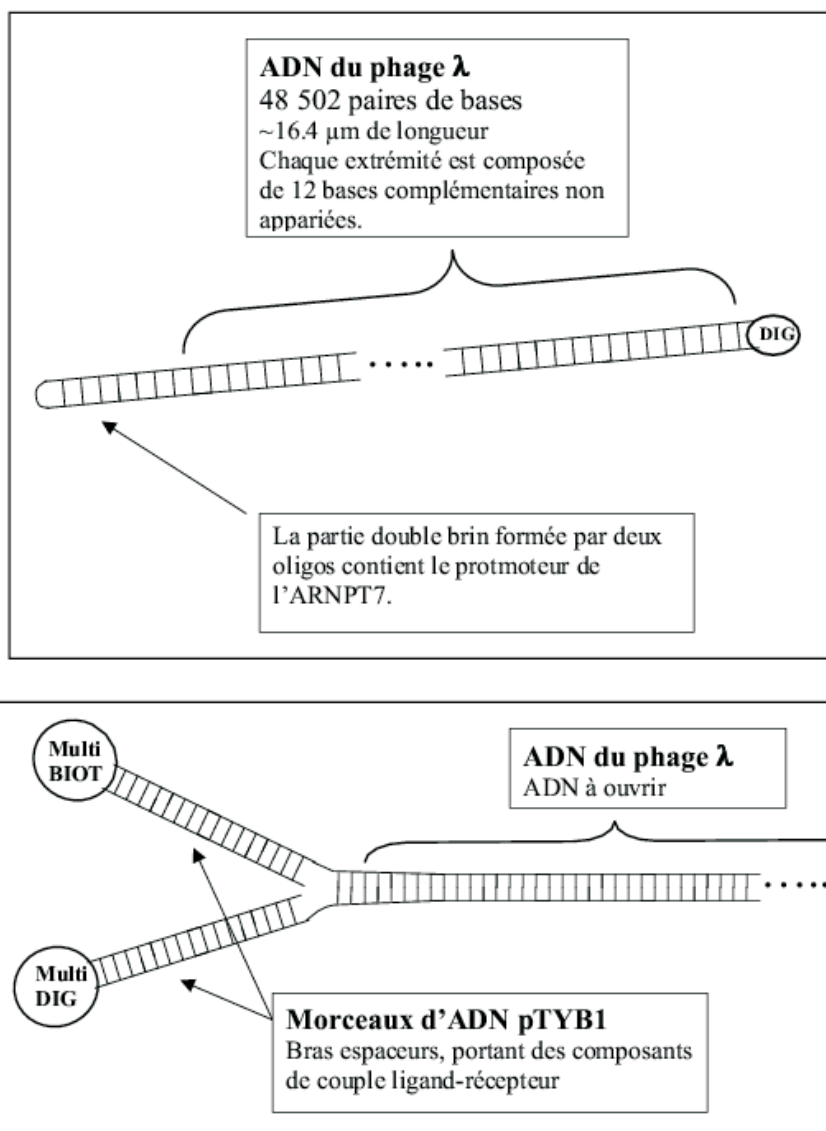


FIG. 4.2 – Schématisation des constructions d'ADN utilisées dans les expériences de transcription (figure du haut) et d'ouverture de la double hélice (figure du bas). Les détails des constructions sont détaillés en annexe 9.4 pour la transcription et dans [119] pour l'ouverture de l'ADN.

des sites spécifiques sur la surface : la biotine libre en solution. En effet, lors de la préparation de la solution de polymérase-biotine (cf annexe 9.2), des biotines libres sont peut-être restées en solution. Nous n'avons pas évalué dans quelle mesure la dialyse censée éliminer les biotines libres a fonctionné. La présence d'autres éléments libres peut être gênante pour le bon déroulement de l'expérience. C'est le cas des billes, qui doivent être introduites en grand nombre au départ pour favoriser l'assemblage bille-ADN λ . Les billes libres perturbent la mesure si elles sont aspirées par le piège.

Les ordres de grandeurs des quantités introduites au départ dans 4-5 μ l sont : ~ 300 milliards de polymérases, ~ 2 milliards de molécules d'ADN, et $\sim 100\,000$ billes. Pour améliorer le rendement de l'expérience (*i.e.* le nombre de constructions complètes attachées spécifiquement), une méthode originale de purification (décrite en détail en annexe 9.3.3) a été mise en place afin d'éliminer les éléments restés libres (biotine, polymérases, ADN, billes) : après l'initiation, le mélange constructions- billes est centrifugé sur un gradient de densité avant d'être déposé à la surface. La masse importante des billes réduit le temps de séparation.

Réaction à la surface

Avec ou sans le passage par la centrifugation, on dépose un mélange de construction moléculaire (du nM au μ M) et de billes ($\sim 100\,000$) sur la surface, de préférence en petit volume (plusieurs dizaines de μ l) pour favoriser l'assemblage des éléments.

En quelques minutes, les billes atteignent la surface par gravité où les attachements construction-surface se forment ; le puits peut alors être déposé sur le microscope inversé. Il est maintenu par des lamelles métalliques formant des ressorts.

En pratique, seule une faible proportion de constructions s'accroche à la surface. Il reste donc beaucoup de constructions libres dans l'échantillon.

Pour repérer une construction correctement ancrée à la surface (ce que l'on nommera "événement"), on crée un écoulement dans l'échantillon en faisant tourner la lamelle supérieure du puits. La rotation de la lamelle est réalisée grâce à de l'air comprimé soufflé temporairement sur les bords de la lamelle. L'ADN sans contrainte est replié sur lui-même en pelote. L'écoulement créé entraîne la bille qui déplie la construction. Quand la construction est étendue, la bille s'arrête.

L'écoulement a un double intérêt : celui de repérer les événements comme on vient de le voir, mais aussi d'évacuer les billes libres ; la rotation de la lamelle induit en effet un écoulement centrifuge à la surface supérieure de l'échantillon et centripète à la surface inférieure. Ainsi, les billes (qui décanter au fond de l'échantillon) sont rassemblées progressivement au centre. Rapidement (quelques minutes), il ne reste que les billes ancrées à la surface sur les bords de l'échantillon.

La recherche d'événements s'effectue au microscope en déplaçant le plateau mobile sur lequel est posé l'échantillon, à l'aide d'une manette permettant d'actionner et de diriger le moteur lié au plateau (cf 3.2.2).

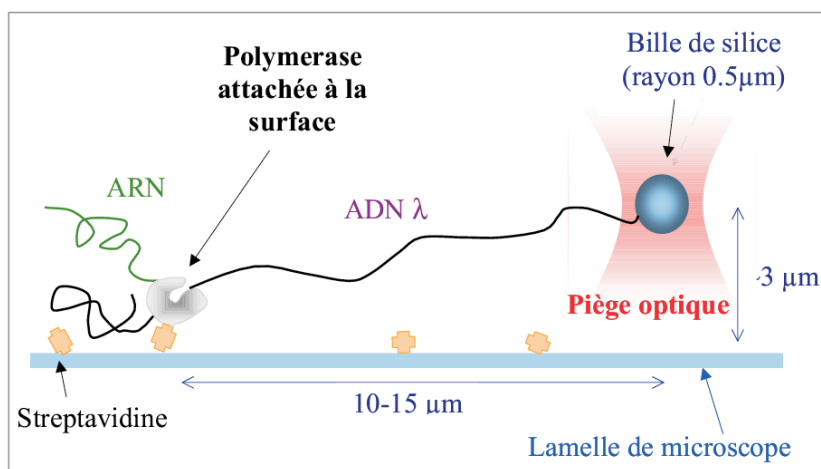


FIG. 4.3 – Schématisation de la configuration expérimentale à un instant t_0 . Une polymérase biotinylée est ancrée via une streptavidine se trouvant à la surface. La séquence promoteur se trouve à une extrémité de l'ADN (à gauche) ; pendant la transcription, le déplacement relatif de la polymérase vis-à-vis de l'ADN est unidirectionnel : la longueur d'ADN comprise entre la polymérase et la bille diminue pour $t > t_0$ et par conséquent, la force exercée par la polymérase sur la bille croît. Afin de maintenir une force constante pendant une expérience, la surface peut être déplacée afin de détendre l'ADN et compenser ainsi la réduction de longueur induite par la transcription. Ce déplacement est contrôlé analogiquement par un montage électronique (cf 3.2.2) à partir de la mesure de force. Dans ce mode, la vitesse est reliée directement au déplacement de la surface (cf 5.1.2).

Pendant l'expérience

Dans toutes les expériences, le piège est fixe, mais la surface est mobile. La puissance du laser utilisée est ~ 40 mW pour les expériences de transcription, et ~ 70 mW pour l'ouverture mécanique de l'ADN. Pour appliquer des forces sur la construction, on éloigne les deux points d'ancrage (billes et surface) en déplaçant la surface (la bille étant maintenue dans le piège fixe). Comme on l'a vu dans la partie 3.2.1, la mesure se fait suivant un axe ; le déplacement de la surface se fait donc toujours suivant l'axe de la mesure. La construction peut être étirée de part et d'autre du point d'ancrage à la surface, ce que l'on appelle un "étirement droite-gauche". Cet étirement permet de vérifier approximativement la bonne longueur de la construction. Une configuration schématique de l'expérience de transcription est donnée sur la figure 4.3.

Comme on le voit sur la figure 4.4, le signal de force est positif ou négatif suivant la direction choisie : le signe est donné par la position de la bille par rapport au centre du piège. Une détente correspondant à une force physique proche de zéro permet de vérifier l'existence d'une éventuelle dérive du niveau de force. Sur la figure 4.4 qui correspond à une expérience de transcription, on remarque après l'ajout des nucléotides une réduction de la longueur, mettant en évidence l'activité de l'enzyme.

Au cours de l'expérience, il est parfois nécessaire de modifier la solution contenue dans le puits (pour la transcription, il faut ajouter les nucléotides ; pour l'expérience de dissociation du

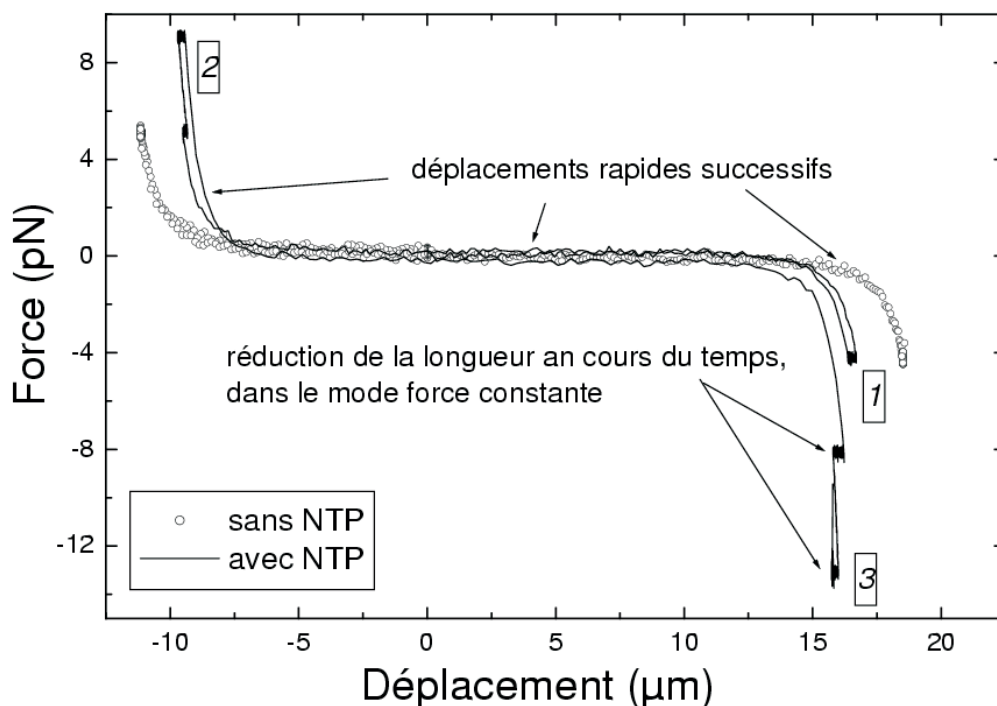


FIG. 4.4 – Etirement "droite-gauche" sur une construction polymérase-ADN-bille avant (○) et après (—) l'ajout des NTP. On représente la force en fonction du déplacement imposé. Les chiffres indiquent l'ordre chronologique dans lequel les étirements ont été pratiqués après l'ajout des NTP. Le signe de la force indique le sens dans lequel se déplace la bille dans le piège. La mesure de force effectuée est relative : la courbe a été translatée en y afin que la partie correspondant à un étirement petit devant la longueur de l'ADN ($-5 \lesssim \text{déplacement} \lesssim 10 \mu\text{m}$) corresponde à $F=0$ pN. L'origine des abscisses correspond au point à partir duquel la bille a été piégée et le déplacement imposé. Il est volontairement décalé par rapport au point d'ancrage de la molécule ($\sim 4.5 \mu\text{m}$) : les rayons focalisés formant le piège peuvent en effet endommager la polymérase (qui se trouve au point d'ancrage par définition), et on préfère les éloigner le plus possible pour qu'ils ne perturbent pas l'activité de l'enzyme (G. Wuite a observé une baisse notable d'activité chez l'ARNP d'*E. coli* exposée à un piège optique (communication personnelle)). Les phases où le déplacement varie alors que la force est constante correspondent à l'observation de la transcription dans le mode où le déplacement est contrôlé afin de maintenir une force constante. Pendant les étirements imposés, la boucle de rétroaction servant au mode "force constante" est coupée. Sur la figure, on distingue la réduction de longueur de l'ADN compris entre la polymérase et la bille : (i) en comparant les étirements avant et après l'ajout des NTP; (ii) en comparant les étirements avec NTP au cours du temps; et (iii) directement dans les phases à force constante.

complexe ADN-protéine par ouverture de l'ADN il faut ajouter les protéines). Dans ce cas, on injecte un faible volume ($\sim 10 \mu\text{l}$) concentré, à la micropipette, par les bords de l'échantillon. Une rotation d'une dizaine de secondes de la lamelle supérieure permet de mélanger de façon homogène la nouvelle solution.

Après l'expérience, la surface est rincée à l'eau, et stockée au réfrigérateur sous atmosphère humide.

4.2 Mode opératoire pour la transcription

Pour le protocole précis de préparation, on peut se reporter à l'annexe 9.3.2. Les étapes principales sont résumées ci-dessous. Dans un premier temps, on mélange ADN, polymérase, billes, ATP, CTP, GTP, UDP¹, le tout concentré, en petit volume ($5\mu\text{l}$) de façon à former les complexes arrêtés en +15. Ensuite on purifie les complexes pour éliminer les éléments libres par la méthode de centrifugation décrite en annexe 9.3.3. Enfin, on récupère la fraction d'intérêt et on la dépose sur la surface du puits.

Un fois l'échantillon posé sur le microscope, la première étape consiste à rechercher des "événements" (construction entière : polymérase immobilisée sur la surface, ADN, bille) comme décrit ci-dessus et à enregistrer via une interface Joystick-PC (cf 3.2.2) leur position dans l'échantillon.

Même si l'on a gardé uniquement les billes attachées à de l'ADN à la sortie de la centrifugation, les ADN n'ont pas forcément une polymérase liée au promoteur ; de plus la réaction d'attachement à la surface (biotine de la polymérase - streptavidine de la surface) n'est pas très favorable. Il reste donc une quantité importante de billes libres devant le nombre d'événements effectivement observés.

Après 3 à 6 minutes d'enregistrement de positions, un événement est choisi au hasard ; le piège est mis en position de fonctionnement en écartant la lentille défocalisante du trajet du faisceau (cf 3.2.2) et la bille est capturée ; un étirement de chaque côté du point d'ancrage ("étirement droite-gauche") est effectué en déplaçant la surface afin de vérifier approximativement la longueur de l'événement et son attachement spécifique.

Le piège est ensuite "désactivé" (la lentille défocalisante est remise sur le trajet de laser, cf 3.2.2). Les quatre nucléotides sont alors introduits, en injectant $10 \mu\text{l}$ d'un mélange des quatre nucléotides dilués dans de l'eau. Le mélange avec la solution dans le puits est effectué en faisant tourner la lamelle ronde supérieure (voir ci-dessus).

Une fois le mélange effectué, on peut repiéger la bille. Deux modes de mesures sont alors possibles :

1. **le mode "extension constante"** : on déplace la surface afin d'étirer la molécule d'ADN et provoquer une montée en force ; lorsque la force monte, on stoppe le déplacement. La polymérase transcrivant "tire" l'ADN vers elle et la longueur effective de l'ADN entre elle

¹L'utilisation de UDP non incorporable est justifié en annexe 9.3.2 ; elle est supposée stabiliser le complexe qui attend un UTP en +16.

et la bille diminue : la polymérase exerce donc une force sur la bille qui augmente au cours du temps.

2. **le mode "force constante"**, dont on a déjà parlé : on impose une force constante grâce à un déplacement rétroactif de la surface, guidé automatiquement par la mesure directe de force (cf 3.2.2).

Quand la polymérase ne transcrit pas ou plus, ou que l'un des attachements a lâché, on commande à l'ordinateur de se diriger vers une position préenregistrée, et on recommence l'expérience à partir de l'étirement droite-gauche. L'intérêt d'enregistrer des positions préalablement se comprend ici : une fois que les NTP sont ajoutés, le temps de l'expérience est limité car il ne faut qu'une dizaine de minutes à l'ARNPT7 pour transcrire l'ADN λ^2 . L'enregistrement permet donc de gagner du temps. On continue ainsi une dizaine de minutes (suivant la concentration en nucléotides) ; on peut espérer une à trois transcriptions (sur des molécules différentes) par expérience. Parfois aucune transcription n'est obtenue.

4.3 Une longue marche d'approche

L'expérience de transcription telle qu'elle est présentée dans ce manuscrit a été tout particulièrement délicate à mettre en place. Si la partie principale de la thèse est consacrée aux résultats expérimentaux, une très grande partie du travail a cependant consisté à trouver les conditions permettant d'obtenir ces résultats. Particulièrement, il a fallu :

- sélectionner un promoteur permettant de stabiliser le complexe ADN-polymérase arrêté en élongation, mais permettant un nouveau départ de la transcription pendant l'expérience, puis l'insérer dans une construction moléculaire adaptée ; l'une des difficultés vient de la stabilité du complexe ADN/ARNPT7 qui est de l'ordre de quelques minutes, contrairement au complexe ADN/ARNP d'*E. coli* qui est stable ~ 24 h. Nous avons notamment cherché à utiliser un promoteur partiellement simple brin et décrit comme particulièrement stable. Nous avons ensuite abandonné cette construction car le redémarrage de la polymérase était très inefficace.
- chercher une méthode de purification des complexes afin d'éliminer les "éléments libres" (billes, ADN, polymérases), gênants pour la mesure et le bon déroulement de l'expérience, ce qui a finalement conduit à établir le protocole de purification par centrifugation sur gradient de sucrose.
- exprimer une protéine portant un groupement chimique spécifique permettant de l'ancrer à la surface mais n'altérant pas le bon fonctionnement de la protéine (travail réalisé par P. Lopez). Les premiers tests réalisés au laboratoire concernaient une polymérase portant des Histidines en N-terminal et déposée sur une surface présentant des complexes au nickel. D'autres configurations ont ensuite été testées (cf 9.3).

²En admettant qu'il n'y a aucune séquence d'arrêt sur la séquence du λ , en prenant une vitesse de 100 bases/s et une séquence de $\sim 48\,000$ bases, le temps pour transcrire les 48 kb est 8 minutes. Dans les expériences à "basses" concentration en NTP, la vitesse est réduite et le temps de l'expérience est allongé.

- rechercher les meilleures conditions de tampons et de température pour améliorer la stabilité du complexe ADN-polymérase durant l'expérience.
- améliorer au mieux la stabilité du système de mesure de force (travail réalisé avec A. Dawid), et mettre en place le système de rétroaction maintenant une force constante pendant l'expérience.

En annexes (chapitre 9), plusieurs de ces points sont abordés. On présente notamment les protocoles finalement retenus pour la préparation des polymérases, des constructions d'ADN, des billes, ainsi que les protocoles de purification par centrifugation et de préparation d'une expérience de transcription.

Chapitre 5

Transcription par l'ARN polymérase de T7

5.1 Caractéristiques des données et méthode de traitement

Dans cette partie, on décrit quelles mesures sont effectuées sur le système ainsi que les caractéristiques générale observées, indépendamment de la force de charge appliquée.

5.1.1 Paramètres mesurés

Les paramètres d'intérêt auxquels on a accès sont la force F exercée par la polymérase sur la bille, l'extension de la construction Ex (distance entre le point d'ancrage de la polymérase sur la surface et la bille), la longueur effective L de l'ADN (longueur d'ADN¹ entre la polymérase et la bille) et le temps t . $F(t)$ et t sont mesurés pendant l'expérience. On mesure aussi la distance, dans le plan de l'échantillon, entre la polymérase et la bille $Y(t)$, ainsi que la hauteur du piège par rapport à la surface $z(t)$. Sur la figure 5.1, on présente schématiquement la configuration expérimentale à un instant t de la transcription. $Ex(t)$ se déduit de $Y(t)$ et $z(t)$ (cf. équation 3.4.2). La longueur effective L d'ADN comprise entre la polymérase et la bille se déduit de la relation existant entre F , Ex et L . Les propriétés élastiques de l'ADN sont non linéaires. Une expression qui rend compte des données expérimentales obtenues lors de l'étirement d'une molécule d'ADN est celle d'Odijk [84] :

$$\frac{Ex}{L} = 1 + \frac{F}{K_0} - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{kT}{FA}} \quad (5.1.1)$$

où K_0 est une constante et A la longueur de persistance de l'ADN². La relation est valide tant que : $L - Ex \ll L$, *i.e.* dans un régime où la force n'est pas trop faible³. Dans les calculs on prend $A=50$ nm [85] et $K_0 \sim 1000$ pN (déterminé expérimentalement). Le terme $1/2 \cdot \sqrt{kT/FA}$ provient de l'élasticité d'origine entropique. Cette contribution ne fait pas intervenir d'étirement local de l'ADN (la distance inter-base est constante) : la molécule se comporte alors comme une

¹On définit simplement la longueur d'ADN comme le nombre de base multiplié par 0.33 nm.

²La longueur de persistance représente la distance au-delà de laquelle les mouvements locaux de l'ADN liés à l'agitation thermique ne sont plus corrélés.

³La relation est valide dans la gamme de force utilisée dans nos expériences, *i.e.* dans la gamme 2-20 pN.

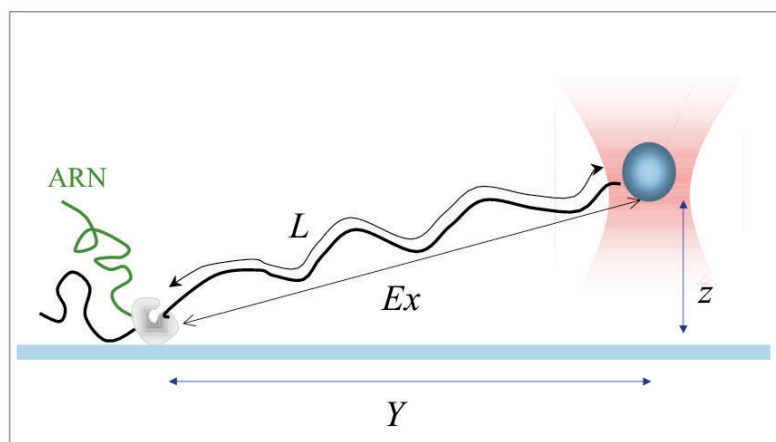


FIG. 5.1 – Schéma de la configuration expérimentale ; L est la longueur de l'ADN comprise entre la polymérase et la bille (en fait, $L = \text{nombre de bases} \cdot 0.33 \text{ nm}$) , Ex est la distance entre la bille et la polymérase, z la distance entre la surface et le piège ($3\text{-}6 \mu\text{m}$), et Y est le déplacement de la surface par rapport au piège fixe.

corde pliée localement par l'agitation brownienne. Le terme F/K_0 traduit le fait que la structure de la molécule est étirable à la manière d'un ressort. Cela signifie qu'en appliquant une force, la structure locale du double brin est modifiée et la distance inter-base s'agrandit. Cependant, pour des forces inférieures à 20 pN, cette déformation est négligeable : à 20 pN, $F/K_0 \sim 20 \text{ pN} / 1000 \text{ pN} = 0.02$, ce qui signifie qu'en l'absence de fluctuations thermiques, une force de 20 pN étire l'ADN de 2%. Ceci est dû à la grande valeur de K_0 et traduit le fait que la molécule d'ADN double brin est en fait peu étirable. Dans la mesure où les forces exercées dans nos expériences n'excèdent pas la vingtaine de piconewtons, on considérera que la structure locale du double brin d'ADN est très peu modifiée par la contrainte mécanique imposée, et que la distance inter-base reste constante.

Nos mesures expérimentales d'étirement de molécule d'ADN ne sont pas tout à fait reproductibles d'une molécule à l'autre⁴, et ne sont donc pas toujours en accord avec l'expression 5.1.1. Même avec une bonne précision sur la mesure de force et sur la mesure du déplacement, il est par conséquent difficile de déterminer la longueur $L(t)$ avec exactitude.

On présente maintenant un mode de mesure possible d'après la configuration expérimentale adoptée, mais qui n'a pas été retenu pour étudier la transcription de l'ARNPT7.

Mode Ex constant.

Lors d'une expérience dans ce mode où le piège et la surface sont fixes, (cf 4.2), ce sont les paramètres $L(t)$ et $F(t)$ qui varient. Pendant la transcription, $L(t)$ diminue et $F(t)$ augmente. Ce mode permet d'obtenir la vitesse de transcription sur une gamme de force continue. Cependant,

⁴Une explication pourrait venir de la méthode d'attachement des constructions sur la surface : les polymères portant les streptavidines ont une longueur inconnue, qui peut varier d'un polymère à l'autre. Leur contribution dans l'élasticité totale de la construction n'est peut-être pas négligeable.

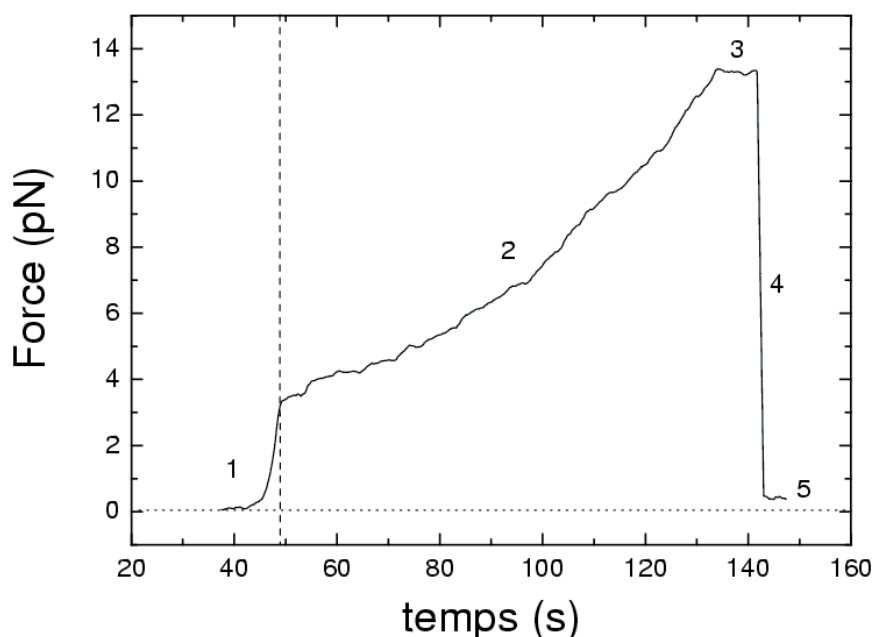


FIG. 5.2 – Force en fonction du temps dans le mode Ex constant (température de la pièce ; $[NTP]=625 \mu M$ chaque ; $Ex \simeq 9 \mu m$; les données sont échantillonnées à une fréquence de 20 Hz (coupure à 8.8 Hz) puis moyennées sur 25 points). **1)** la surface est tout d'abord déplacée pour imposer une contrainte mécanique ($t \lesssim 50$ s) ; **2)** le déplacement est ensuite stoppé : la polymérase réduit la longueur d'ADN entre elle et la bille et exerce donc une force qui croît au cours du temps ; **3)** la polymérase marque une pause ($t \approx 130$ s) ; **4)** un attachement est brisé, peut-être la polymérase s'est dissociée de l'ADN ; **5)** le décalage par rapport au zéro de force à $t \sim 40$ s montre qu'il y a eu une légère dérive du niveau de force durant les ~ 100 s de mesure. On remarque que la polymérase passe ~ 35 s entre 4 et 6 pN et ~ 10 s entre 11 et 13 pN, à cause de la non-linéarité de l'élasticité de l'ADN.

les propriétés élastiques de l'ADN sont telles que le temps passé à 3-5 pN est beaucoup plus long que celui passé vers 15-17 pN. Ceci est illustré sur la figure 5.2.

Comment obtenir la vitesse de transcription $V(t)$ dans ce mode ? De $F(t)$ et Ex , on tire $L(t)$ grâce à l'expression analytique reliant ces trois paramètres. On peut ensuite calculer $dL(t)/dt$ numériquement, mais cette méthode pose un problème. Il faut définir un niveau de filtrage des données ; car à cause du bruit, une dérivée calculée sur des données non filtrées donne une vitesse instantanée variant très rapidement et qui peut être négative. Il est difficile de choisir le bon niveau de filtrage car *on ne peut pas savoir si les variations locales de vitesse sont dues à la polymérase ou au bruit*. D'autre part, le bruit dépend du niveau de force : à basse force, la raideur mécanique totale du système est petite, donc l'amplitude du mouvement de la bille dans le piège est grande [119]. Il n'est donc pas possible de filtrer de la même façon à basse force et à haute force. La meilleure solution est d'effectuer des régressions linéaires de $L(t)$ par domaine de force. Ce mode n'a donc pas été choisi, à cause des incertitudes dans la détermination de la longueur et celle de la vitesse, et enfin parce qu'il ne permet pas de passer autant de temps à

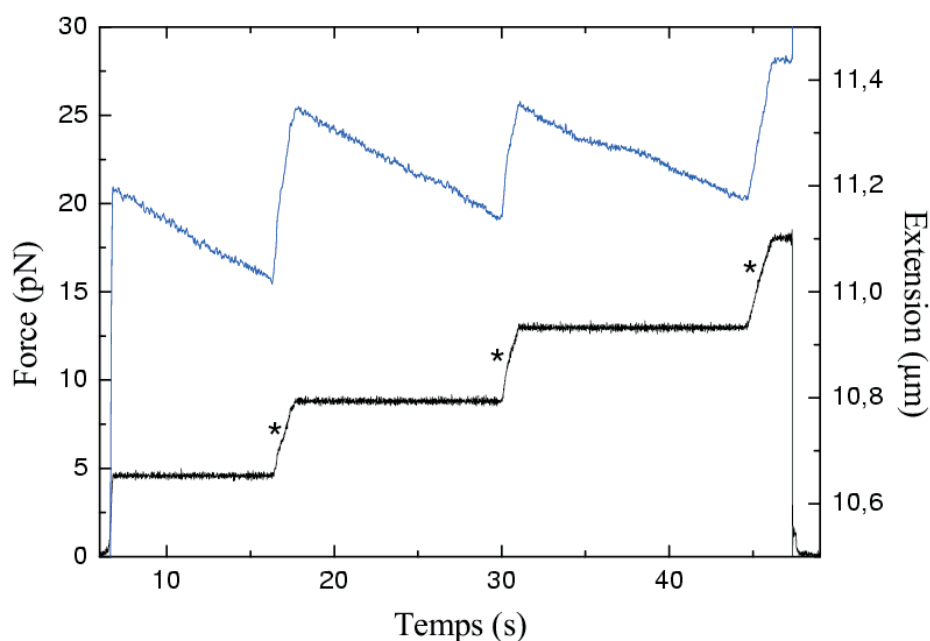


FIG. 5.3 – Enregistrement de la force (courbe du bas) et de l'extension (courbe du haut), en fonction du temps pendant une transcription, dans le mode force constante; les étoiles indiquent un changement de consigne de force. Les "sauts" d'extension correspondent à l'ajustement nécessaire pour appliquer la nouvelle consigne de force (pour exercer une force plus importante, la molécule doit être étirée, d'où une augmentation de l'extension).

basse force qu'à haute force.

5.1.2 Caractéristiques générales

Dans ce paragraphe, on décrit le mode de mesure adopté pour l'étude de la transcription, comment le calcul de la vitesse est effectué et quelle précision on peut attendre des mesures. Quelques caractéristiques générales de la transcription y sont également détaillées.

Fluctuations du signal; calcul de la vitesse

Dans le mode force constante, une boucle de rétroaction déplace la surface pendant la transcription afin que la force de charge soit maintenue constante, le piège restant fixe (cf 4.2 et 3.2.2). Dans cette configuration, $Ex(t)$ et $L(t)$ diminuent. Ce mode permet potentiellement d'étudier : (i) les effets de séquence à une force donnée, (ii) l'influence de la force sur les pauses, arrêts, variations de vitesses... ainsi que (iii) d'autres phénomènes susceptibles de se produire pendant l'expérience. Un exemple de mesure dans ce mode est donné sur la figure 5.3.

Pour estimer quelle précision on peut attendre des mesures, on compare sur la figure 5.4 un enregistrement d'une expérience de transcription avec un enregistrement d'une expérience où la vitesse est nulle. Plus précisément, on compare l'extension au cours du temps lors d'une

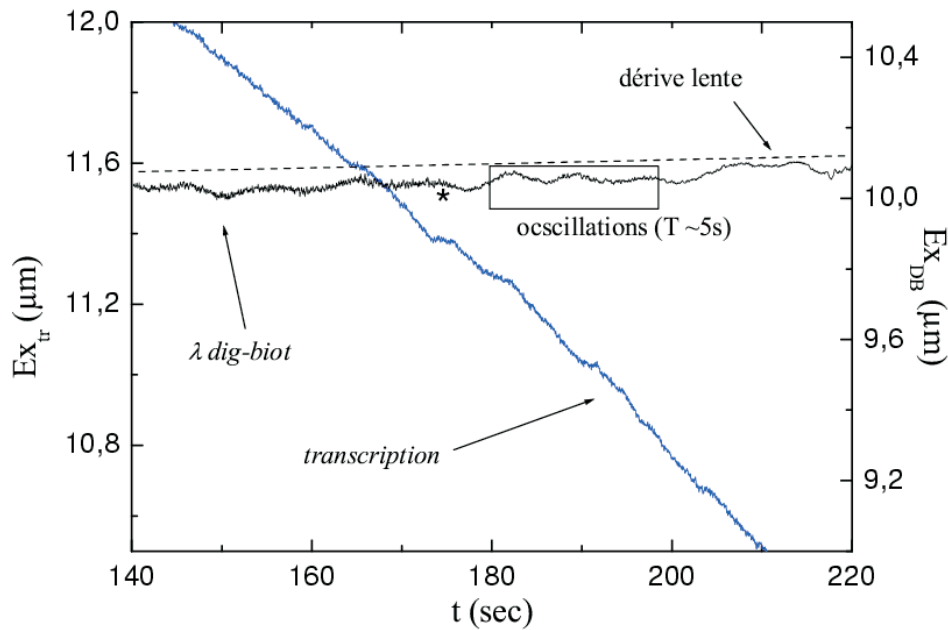


FIG. 5.4 – Comparaison entre l’extension au cours du temps lors d’une transcription ($F=5$ pN; $[NTP]=150$ μ M chaque; $T=27^\circ$ C) et l’extension d’un λ Dig-Biot (construction d’ADN à longueur “fixe”, voir dans le texte) sous une contrainte de 5 pN. Pour le λ Dig-Biot, on relève les trois contributions de bruit discuté dans le texte : (i) des fluctuations très rapides et de faibles amplitudes; un changement de la constante de temps τ de la boucle de rétroaction déplaçant la surface affecte cette contribution (vers $t=175$ s) : $\tau=2.2$ ms avant le signe *, et $\tau=4.8$ ms après; (ii) des fluctuations sur un temps caractéristique de ~ 5 s; (iii) une dérive très lente et continue (ici ~ 1 nm/s) lié directement à la dérive du niveau de force.

expérience de transcription en mode F constant et l’extension au cours du temps dans le même mode, d’un ADN λ sous une tension de 5 pN, ancré à la surface par un bout et à une bille à l’autre bout⁵ (on doit avoir théoriquement $dEx/dt=0$ dans ce cas). Par la suite, une construction d’ADN λ portant une biotine à une extrémité et un groupement digoxygénine à l’autre, utilisée pour un ancrage de longueur fixe entre une bille et la surface est appelée λ Dig-Biot (ou λ_{DB}).

On distingue clairement l’événement de transcription en comparant les pentes moyennes entre l’enregistrement obtenu pour le λ Dig-Biot et celui obtenu lors d’une transcription. Sur l’enregistrement avec le λ Dig-Biot, on distingue trois contributions de bruit suivant le temps caractéristique des variations : (i) des fluctuations rapides de faible amplitude, directement reliées à la constante de temps de la rétroaction (période ~ 0.2 s et amplitude pic-pic ~ 15 nm quand la constante de rétroaction τ vaut 2.2 ms), (ii) des fluctuations plus lentes et de plus grande amplitude (période ≈ 5 s; amplitude pic-pic : 50 nm), (iii) des variations qui semblent linéaires à l’échelle de la minute, reliées à la dérive du niveau zéro de force.

L’origine des oscillations (deuxième contribution) n’a pas été identifiée, malgré une analyse

⁵Les ancrages sont les suivants : biotine-streptavidine pour l’ADN sur la bille, et digoxygénine-antidigoxygénine pour l’ADN sur la surface

détaillée de diverses origines possibles : elle n'est pas due à la régulation de l'angle du faisceau laser, ni à des fluctuations de la position du laser, ni à des fluctuations de l'intensité du laser, ni à la rétroaction déplaçant la surface. Ces oscillations n'apparaissent cependant pas de façon systématique⁶. Il existe des corrélations entre la position du laser et le niveau de force : elles sont détectées grâce à une photodiode à quatre cadrans captant une réflexion du laser à l'entrée du microscope. Cependant, la dérive qui en résulte intervient uniquement à l'échelle de 10 min. Les variations de la position du laser proviennent des fluctuations de l'intensité du faisceau. Ces fluctuations étant petites en amplitude et lentes devant le temps typique d'une mesure de vitesse, elles ne sont pas susceptibles de perturber les mesures effectuées pendant une expérience de transcription.

Lors d'une expérience, on pratique régulièrement des détentes (retour à une contrainte mécanique proche de zéro) pour contrôler la dérive éventuelle du niveau zéro de force. La fonction analytique reliant F , Ex et L (équation 5.1.1) permet de calculer $L(t)$ à partir de F et $Ex(t)$. La vitesse de transcription est simplement définie par $-dL(t)/dt$. Sur la figure 5.5 est représenté l'enregistrement entier de l'expérience de transcription présentée partiellement sur la figure 5.4. La zone désignée par un "P" correspond à un changement net de pente qui a pour origine une pause de l'enzyme.

En excluant des données la pause longue, on peut définir une vitesse moyenne sur tout le temps d'enregistrement. Les variations de la vitesse instantanée autour de cette moyenne sont pour certaines reliées directement au bruit de l'expérience, d'autres expriment un réel changement de vitesse opéré par l'enzyme. Pour l'illustrer, on compare, sur la figure 5.6 l'extension au cours du temps de l'ADN λ Dig-Biot et la différence⁷ :

$$Ex(t) - \left\langle \frac{dEx(t)}{dt} \right\rangle . t$$

pour l'expérience de transcription de la figure 5.4.

On remarque que les principales variations de vitesse mesurées correspondent à la deuxième contribution de bruit : les oscillations de période ~ 5 s. Pour définir la vitesse de l'enzyme, on décide donc, pour tenir compte des limitations expérimentales de la mesure, de calculer la variation moyenne de $Ex(t)$ sur au moins ≈ 10 s. La précision sur la valeur moyenne de la vitesse de transcription augmentera avec le temps sur lequel elle a été calculée. Sur cette même expérience de transcription, on a calculé à chaque instant une vitesse sur une durée τ donnée. On présente sur la figure 5.7 les histogrammes des vitesses pour trois valeurs de τ différentes : 2 s, 10 s et 20 s. La pause a été retirée des données pour ce calcul.

La moyenne est sensiblement la même dans les trois cas mais l'écart type diffère. Le gain de précision en passant de $\tau = 10$ à 20 s n'est pas très important comparé à celui obtenu en passant de $\tau = 2$ à 10 s ; ceci est conforme à l'observation précédente : il faut moyenner la vitesse sur un temps τ supérieur à la période de 5 s du bruit. **Sur un enregistrement de ~ 10 s de $Ex(t)$ pendant une transcription à une force F donnée, on définit la vitesse comme la**

⁶Une hypothèse possible est que l'instabilité provient d'un effet de convection dans l'huile de l'objectif à immersion

⁷Par cette opération, on retire la progression moyenne de l'enzyme, et on ne garde que les fluctuations locales dues aux variations de la vitesse instantanée autour de la vitesse moyenne.

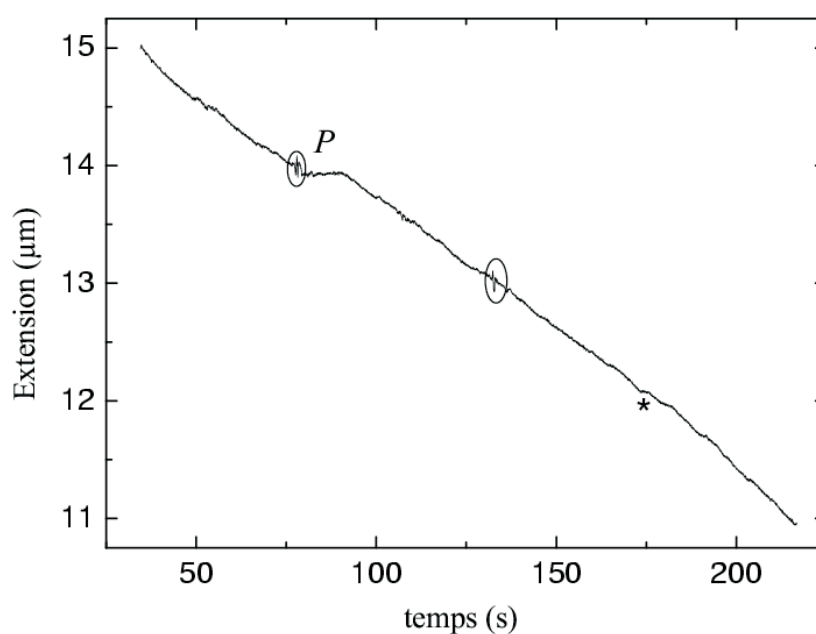


FIG. 5.5 – *Extension au cours du temps lors d’une transcription à 5 pN, $[NTP]=150\ \mu\text{M}$ chaque et $T=27^\circ\text{C}$. Acquisition des données : $f=100\ \text{Hz}$, coupure à 44 Hz. Le P indique une rupture nette de pente caractéristique d’une pause, l’étoile indique une variation plus courte qui peut éventuellement correspondre à une pause, ou bien résulter des fluctuations de la mesure. Les portions entourées montrent des fluctuations de grande amplitude liées à une perturbation lors de l’expérience (vibration sonore ou courant d’air).*

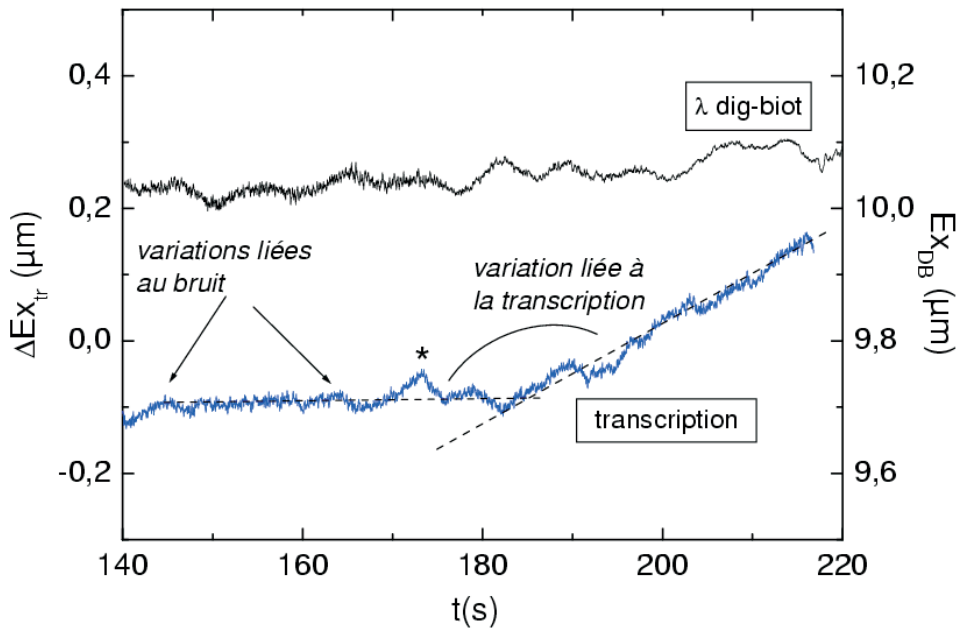


FIG. 5.6 – Comparaison entre $\Delta Ex(t) = (Ex(t) - \langle \frac{dEx(t)}{dt} \rangle . t)$ pour la transcription de la figure 5.5 et $Ex(t)$ pour le λ Dig-Biot. La quantité $\Delta Ex(t)$ permet de visualiser les fluctuations de la vitesse instantanée autour de la vitesse moyenne. Certaines variations de la vitesse instantanée sont directement liées aux fluctuations de la mesure (à gauche), d'autres traduisent une réelle variation de la vitesse de transcription (à droite), identifiée par une pente moyenne plus importante que les dérives observées sur le λ Dig-Biot. L'étoile indique la variation notée par le même symbole sur la figure 5.5.

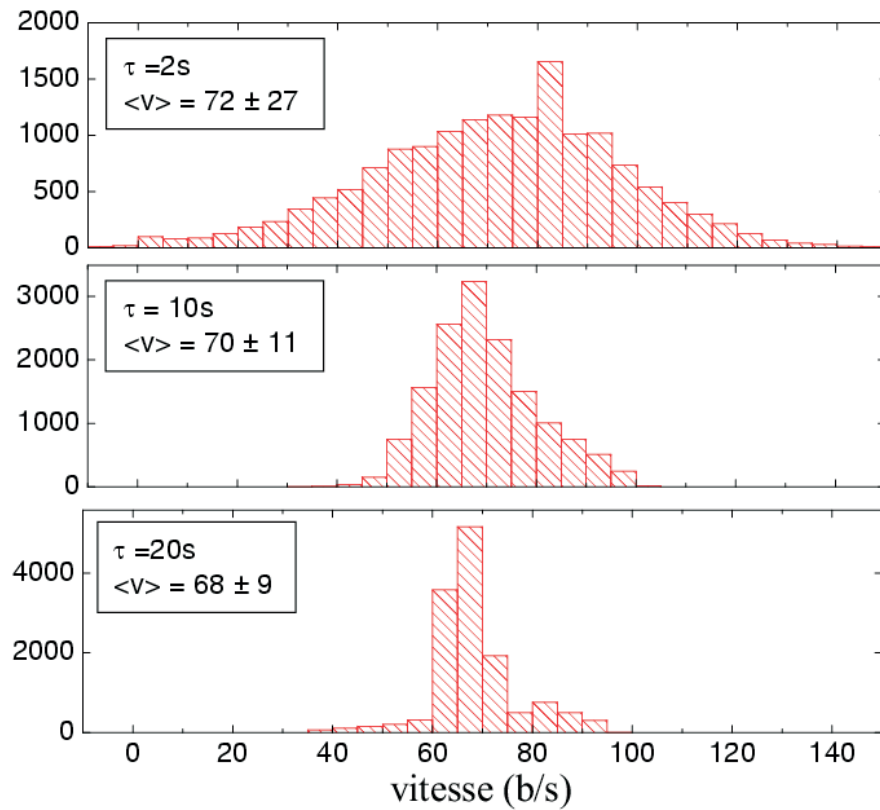


FIG. 5.7 – Histogrammes des vitesses calculées sur un temps τ ($\tau = 2s, 10s$ et $20s$) sur les données de la transcription de la figure 5.5. A chaque instant t , on définit : $V(t) = -\{Ex(t) - Ex(t + \tau)\}/\tau$.

pende $-a(F).dEx(t)/dt$ où $a(F)$ est le facteur lié à l'élasticité de la molécule d'ADN, défini par :

$$a(F) = \frac{Ex}{L} = 1 + \frac{F}{Ko} - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{kT}{FA}}$$

Variabilités

Le calcul de la vitesse par cette méthode de régression linéaire sur la mesure de $Ex(t)$ présente un avantage : le résultat est indépendant du bruit à petite échelle de temps (la première des trois contributions énumérées plus haut). Pour définir la vitesse moyenne de la polymérase dans des conditions données (concentration en nucléotides, force), il faut cependant accumuler un grand nombre de mesures car il existe : (i) des variabilités d'enzyme à enzyme, comme cela a déjà été observé dans ce type d'expérience avec d'autres enzymes (références 12 et 13 de [96]), et (ii) des variabilités pour une enzyme donnée.

La figure 5.8 montre la variabilité que l'on peut observer sur une polymérase sous une

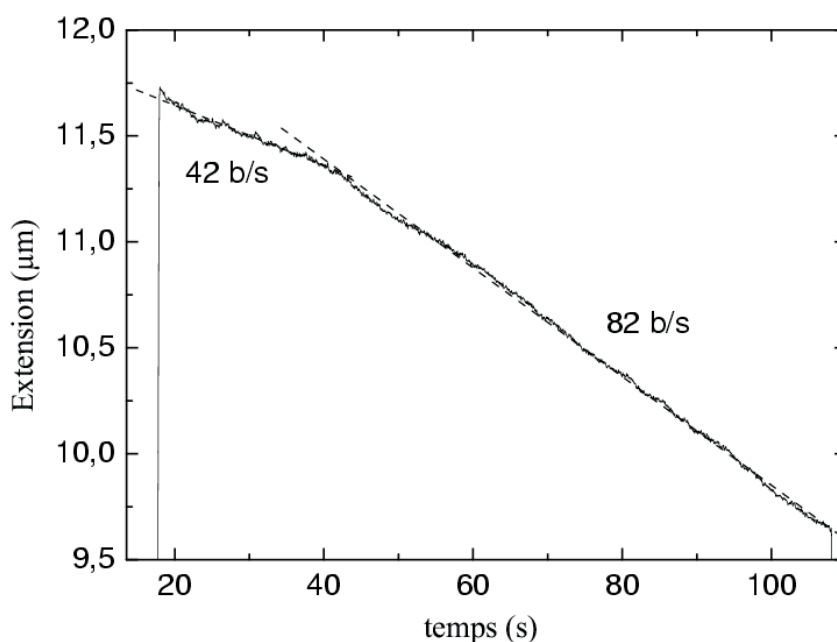


FIG. 5.8 – Extension en fonction du temps lors d'une transcription sous une contrainte de 5 pN, $[NTP]=150\text{ }\mu\text{M}$ chaque, $T=27^\circ\text{C}$. Cette figure illustre les variabilités qui peuvent exister sur une enzyme : le changement de vitesse vers $t \sim 40\text{ s}$ peut être dû à un changement de conformation de la protéine. Les vitesses moyennes calculées d'après les régressions linéaires sont indiquées sur la figure.

contrainte mécanique constante de plus d'une minute : on constate que la polymérase transcrit à une vitesse moyenne de $\sim 40\text{ b/s}$ pendant 20 s (soit presque un kb) puis à une vitesse de $\sim 80\text{ b/s}$ durant ~ 1 minute (soit 5 à 6 kb). Des variabilités peuvent donc apparaître sur une même enzyme maintenue sous une contrainte mécanique constante. Les figures 5.9 et 5.10 illustrent les variabilités observables sur une enzyme lors d'un cycle : mise sous contrainte/détente à force nulle. Lors des expériences dont les résultats sont présentés sur ces figures, on maintient une force de charge pendant $\sim 10\text{ s}$ puis on détend la construction avant d'imposer une nouvelle contrainte. Généralement, la séquence de force est la suivante : 5 pN - 0 pN - 11 pN - 0 pN - 15 pN - 0 pN - 11 pN - 0 pN - 5 pN... Parfois on privilégie un ou bien deux niveaux de force. Comme on le voit sur les figures, la vitesse mesurée à une force donnée sur une polymérase ne donne pas forcément le même résultat si la mesure est effectuée à un autre moment. Cependant, les variabilités sont indépendantes de la séquence de force. On remarque enfin que l'amplitude des variabilités dépend de la polymérase (comparer les deux transcriptions de la figure 5.9). La figure 5.10 montre également les variabilités observables d'enzyme à enzyme : par exemple la vitesse est centrée sur $\sim 130\text{ b/s}$ pour une polymérase (les triangles Δ) contre 60 à 100 b/s pour une autre (les ronds vides \circ).

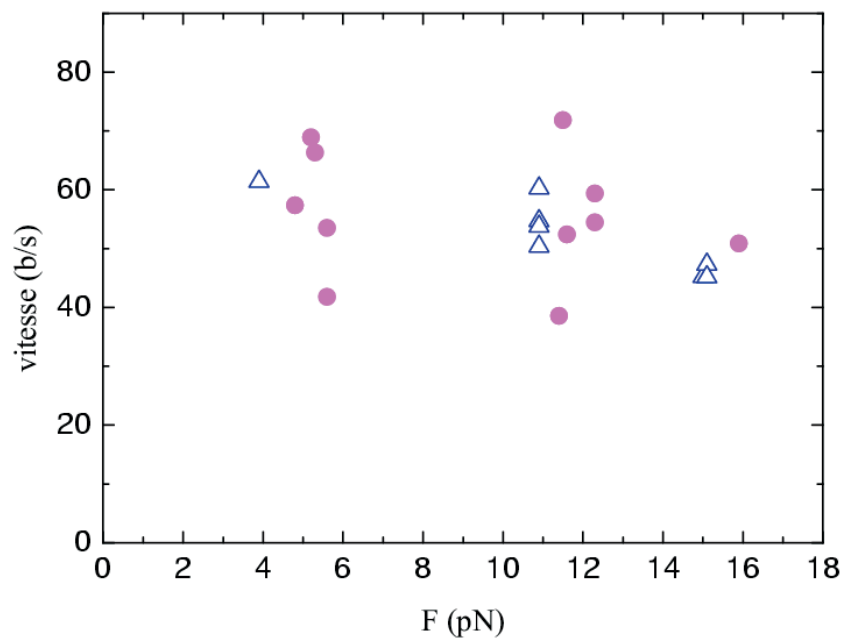


FIG. 5.9 – Variabilité de la mesure de vitesse sur une même enzyme, dans un cycle de tension-détente. On représente la vitesse fonction de la force, mesurée sur deux polymérases différentes ($[NTP] = 150 \mu M$ chaque ; $T = 27^\circ C$). La vitesse est obtenue indirectement par une régression linéaire sur $Ex(t)$; chaque point correspond à une vitesse calculée sous une contrainte constante maintenue pendant $\approx 10s$.

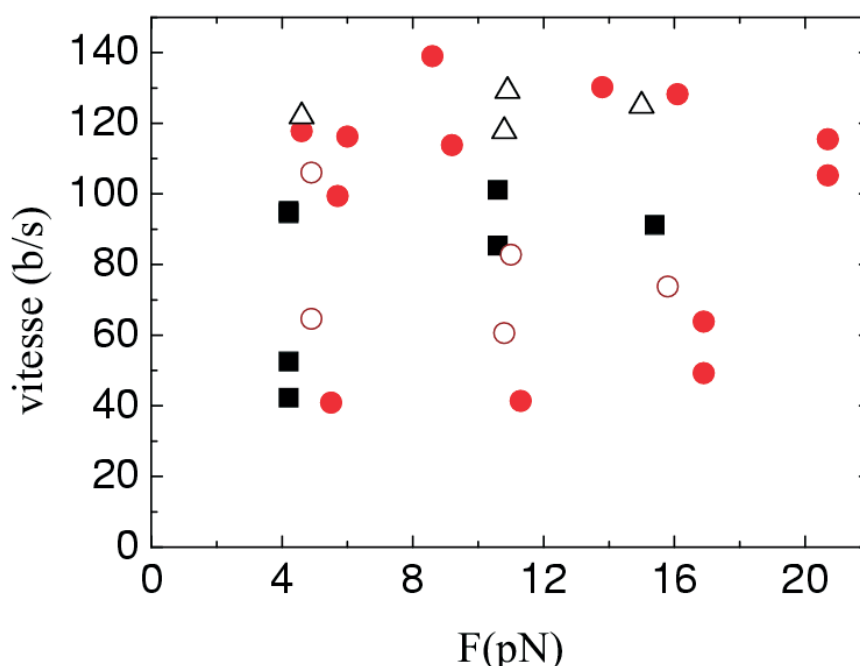


FIG. 5.10 – Vitesse fonction de la force ; chaque symbole se rapporte à une polymérase. Cette figure montre : (i) les variabilités sur une même enzyme : de ~ 40 à ~ 140 b/s pour les \bullet et ~ 40 à ~ 100 b/s pour les \blacksquare ; (ii) les variabilités d'enzyme à enzyme : vitesse centrée vers ~ 130 b/s pour les \triangle , contre 60-100 b/s pour les \circ . Conditions de transcription : $[NTP]=590 \mu M$ chaque ; $T=27^\circ C$.

Effets de séquence

On peut s'attendre à deux types d'influences de la séquence sur la vitesse de transcription de la polymérase : l'influence de séquences particulières comme les séquences de pauses ou d'arrêt, et l'influence due à une affinité éventuellement différente des quatre nucléotides pour le site actif de la polymérase et donc liée à la teneur en bases A, C, G et T dans la séquence codante. Les deux effets peuvent éventuellement se combiner.

Certaines séquences spécifiques d'une longueur de l'ordre de l'empreinte de la polymérase sur l'ADN (~ 20 bases), et/ou les séquences d'ARN qui en résultent, peuvent avoir une structure particulière qui modifie le fonctionnement de l'enzyme, induisant pause ou arrêt (comme par exemple les séquences terminatrices, cf 2.2.5) ; ce type d'effet a été particulièrement observé et étudié sur l'ARNP d'*E. coli* par Davenport et al. [95]. Dans le mode à force constante, l'observation des pauses est facilitée par une vitesse moyenne de transcription élevée, car une pause est d'autant plus visible qu'elle crée une rupture de pente nette non comparable à une dérive typique du signal. De plus, elles doivent durer un certain temps pour être remarquées. Cependant, dans toutes les expériences que nous avons effectuées, les pauses sont très rares (un exemple est donné sur la figure 5.5), et il n'est pas possible d'en faire un traitement particulier comme dans le cas de l'ARNP d'*E. coli*.

Les expériences se terminent de deux façons : soit la polymérase s'arrête définitivement, soit un point d'ancrage de la construction cède (peut-être une dissociation entre l'ADN et la polymérase). Lors de nos expériences, la fin de la transcription est-elle liée à la séquence ? Il est impossible de répondre à cette question car la configuration expérimentale choisie (la mesure de force commence alors que la polymérase a déjà commencé à transcrire) et l'incertitude sur la relation entre l'extension, la longueur et la force (voir début du chapitre) ne permettent pas de déterminer avec assez de précision à quelle endroit sur la séquence d'ADN la polymérase se trouve à un instant t quelconque.

On peut imaginer également des effets provenant de la teneur en bases A, C, G ou T dans la séquence du brin codant. Par exemple, l'affinité différente des quatre nucléotides pour le site actif pourrait moduler la vitesse d'incorporation suivant la séquence transcrite. Pour fixer les idées, une simulation numérique a été réalisée, dans laquelle on considère que la polymérase peut adopter deux vitesses différentes : une vitesse pour la transcription des bases A et T et une seconde pour les bases C et G. Même en imposant un facteur 10 entre les deux vitesses, les variations de vitesse dues à la séquence (celle du λ) sont observables pour $t \lesssim 1$ sec. On s'attend donc à ce que les variations de vitesses qui seraient dues à la nature du nucléotide à incorporer ne soient pas mesurables dans cette expérience, avec la séquence d'ADN utilisée. Par conséquent, on s'attend à ce que la vitesse mesurée lors d'une expérience dépende peu de la séquence transcrite, et puisse être comparée aux mesures de vitesses effectuées à d'autres endroits sur la séquence d'ADN.

5.1.3 Signaux non reliés à l'avancée de la polymérase

Déplissement réversible de la protéine

Au cours de l'expérience, on observe parfois le phénomène suivant : alors que la polymérase transcrit à une vitesse donnée, la construction se rallonge brusquement ($t \sim 50-100$ ms ; la constante de temps de la rétroaction déplaçant la surface est comprise entre 1 et 20 ms suivant les expériences), et dans ~ 80 % des cas, la vitesse de transcription devient ensuite nulle (ou trop petite pour être mesurée) ; l'enzyme retrouve en général une vitesse non nulle après une détente à $F \sim 0$ pN⁸. On identifie cet allongement dx à un dépliement partiel de la protéine comme on le détaille maintenant.

La moyenne calculée sur 64 allongements, est à 27°C : $dx = 48 \text{ nm} \pm 11 \text{ nm}$ (déviations standard) ; pour des températures inférieures, dx est plus dispersé : $dx = 59 \pm 17 \text{ nm}$, comme on peut le voir sur la figure 5.12. La taille de l'allongement ne dépend ni de la force appliquée, ni de la concentration en NTP, dans les gammes étudiées : $F < 20 \text{ pN}$ et $30 < C < 560$ (cf. figure 5.13). La fréquence d'apparition d'un allongement est cependant dépendante de la force. Pour en rendre compte, on porte le nombre d'allongements observés rapporté au temps passé au niveau de force correspondant, en fonction de la force. Le temps passé à un niveau de force correspond au temps

⁸Ce phénomène est observable également dans le mode Ex constant : une chute quasi instantanée de la force se produit, puis $F(t)$ reste constant. Comme dans le mode F constant, la transcription reprend généralement après une détente à $F \sim 0$ pN.

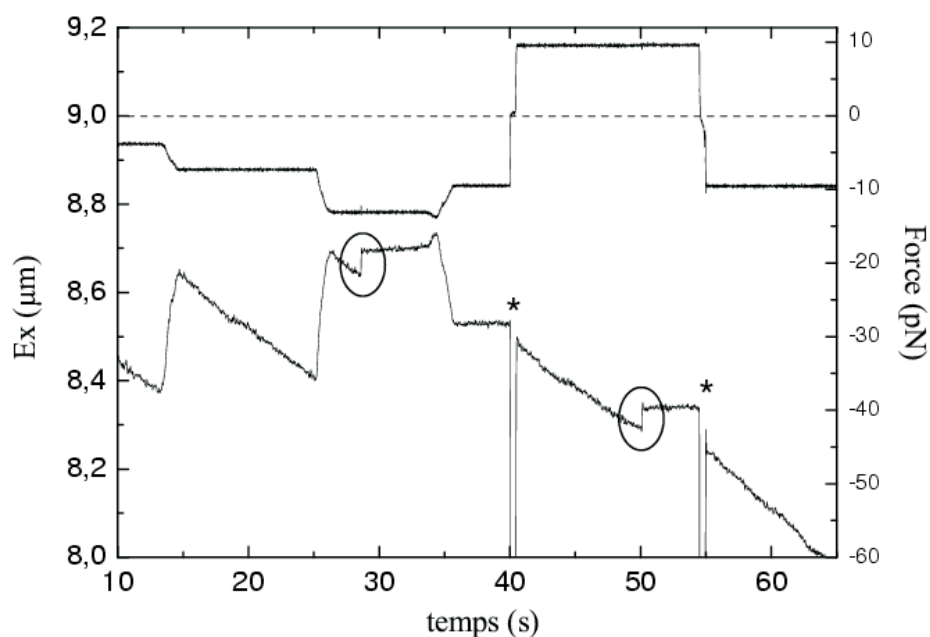


FIG. 5.11 – "Allongements" observés pendant une transcription. La figure représente l'extension (courbe du bas) et la force (courbe du haut) en fonction du temps, lors d'une expérience de transcription. Vers $t \sim 30s$ et $t \sim 50s$ ont lieu deux décrochements d'une cinquantaine de nanomètres (entourés sur la figure), sous des tensions respectives de ~ 12 et ~ 10 pN. Après chaque allongement, la vitesse est proche de zéro. Après une détente vers $F \sim 0$ pN (indiquée par une étoile) la vitesse est non nulle sur la tension suivante. Vers $t \sim 35s$, on remarque qu'une détente à ~ 10 pN après le premier allongement est sans effet sur la vitesse.

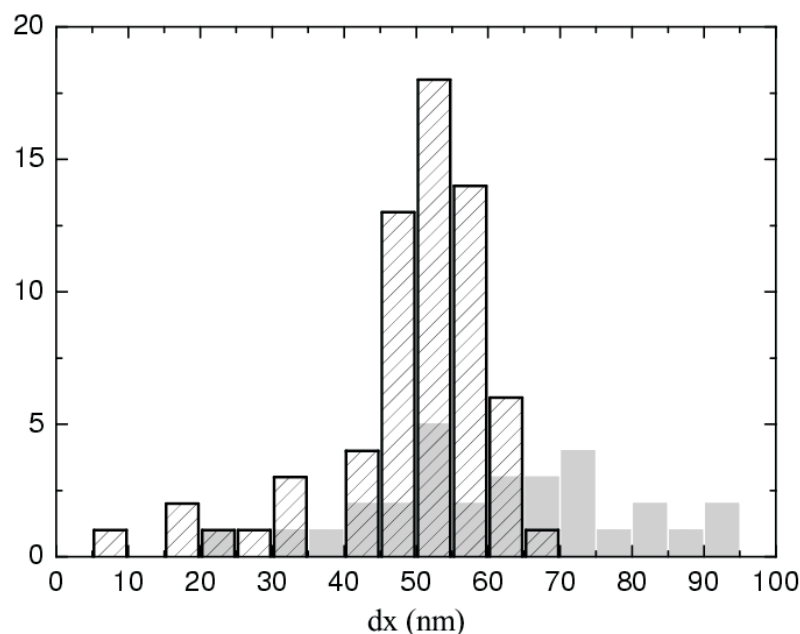


FIG. 5.12 – Histogrammes des allongements à 27°C (en rayé noir) et pour des températures comprises entre 22 et 26 °C (en gris). $\langle dx \rangle = 48 \text{ nm} \pm 11 \text{ (ds)}$ à 27°C et $\langle dx \rangle = 59 \text{ nm} \pm 17 \text{ (ds)}$ pour des températures inférieures. Curieusement, la longueur de l'allongement est plus dispersée pour $T < 26^\circ \text{C}$.

total cumulé d'enregistrement de toutes les expériences de transcription (où $v \neq 0$) au niveau de force considéré. Sur la figure 5.15, on met en évidence l'accroissement de la fréquence d'apparition avec la force⁹. Si cet allongement est un processus activé, on s'attend à une dépendance exponentielle de la fréquence en fonction de la force. L'ajustement par une courbe d'équation : $A \cdot \exp(Fx/kT)$ où A est une constante et x une distance caractéristique est imparfait. Si on suppose malgré tout que la dépendance est exponentielle, la distance caractéristique associée x est de l'ordre du nanomètre.

En résumé, des allongements sont quelques fois observés, (i) leur longueur dx est centrée autour de $\sim 50 \text{ nm}$, (ii) la fréquence de leur apparition augmente avec la force, la modélisation par le franchissement d'une barrière de potentiel associe une distance caractéristique de $\sim 1 \text{ nm}$, (iii) la vitesse de transcription est ensuite très faible ou nulle ($< 10 \text{ b/s}$ dans 4 cas sur 5), mais (iv) la vitesse optimale est retrouvée dans la plupart des cas après une détente à force nulle.

Il est difficile d'envisager que le phénomène observé puisse être relié à un glissement de la polymérase sur l'ADN. En effet, l'allongement moyen de $\sim 50 \text{ nm}$ correspondrait à un glissement de ~ 150 bases. Cette longueur dépasse largement l'empreinte de la polymérase sur l'ADN, et on s'attendrait dans le cas d'un large glissement sur l'ADN, à une longueur de recul aléatoire.

⁹De la même manière, on peut étudier l'influence de la concentration en NTP sur la fréquence d'apparition, mais aucune dépendance n'apparaît clairement (données non présentées)

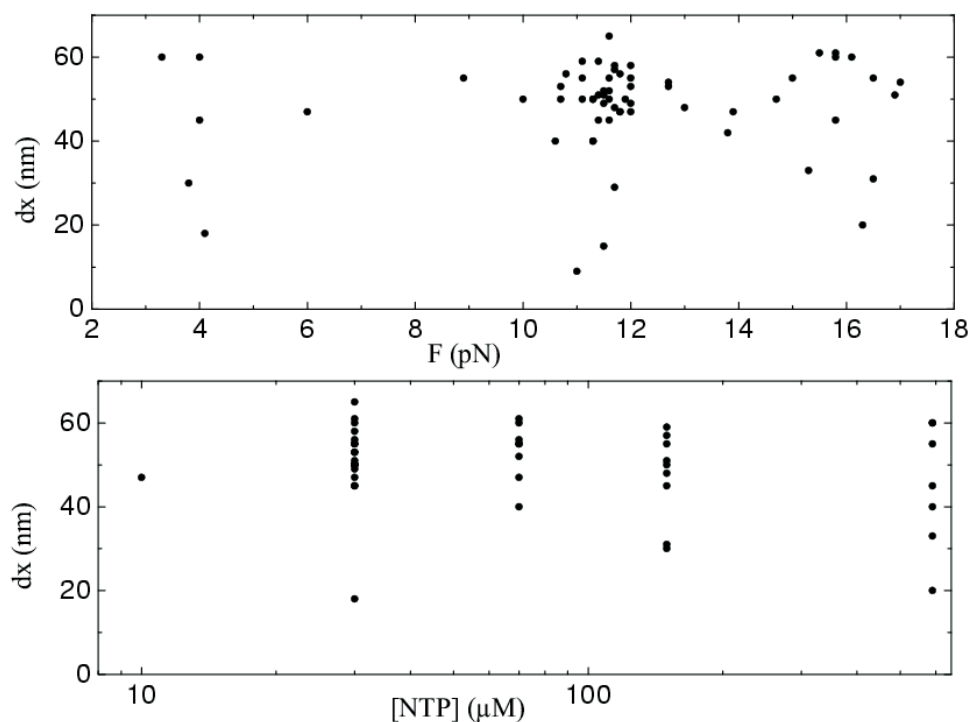


FIG. 5.13 – Allongements dx en fonction de la force de charge (figure du haut), et en fonction de la concentration en NTP (figure du bas ; pour plus de clarté, l'axe des abscisse est en échelle logarithmique). Dans les deux cas on n'observe pas de corrélation.

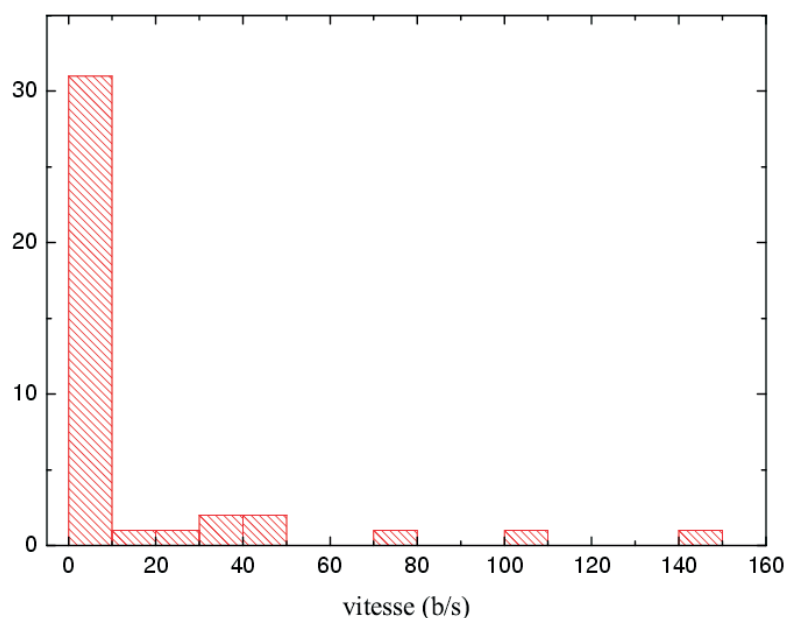


FIG. 5.14 – Histogramme des vitesses après l'allongement ; dans tous les cas, la vitesse était non nulle avant l'allongement. Pour la grande majorité des cas (ici 78 %), la vitesse mesurée est inférieure à 10 b/s après l'allongement.

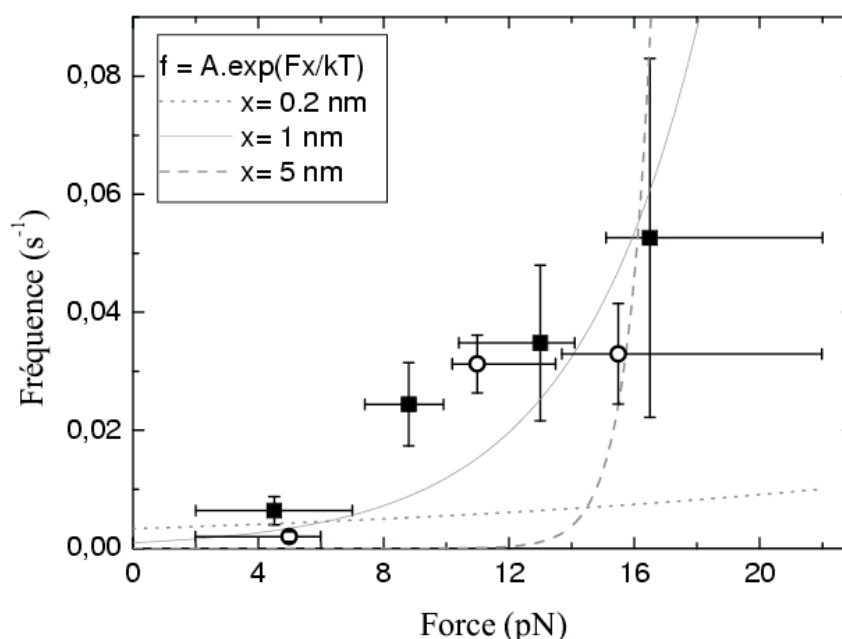


FIG. 5.15 – Fréquence d'apparition d'un allongement en fonction de la force exercée. Le calcul de la fréquence est décrit dans le texte. Les carrés se rapportent aux données obtenues pour des températures comprises entre 22 et 26°C, les ronds aux données obtenues à 27°C. Les barres d'erreur en abscisse donnent les intervalles de force dans lesquels les mesures ont été réalisées ; les barres d'erreur en ordonnée sont données par le rapport entre la fréquence calculée et la racine carré du nombre d'allongements observés. Les trois courbes en grisé sont une modélisation avec dépendance exponentielle pour trois distances caractéristiques différentes : 0.2 nm, 1 nm et 5 nm. La distance de 1 nm semble la plus adaptée pour ajuster les données.

Elle n'a en tout cas aucune raison d'être centrée sur 150 bases. De plus, le fait que la vitesse soit de nouveau non nulle après une détente à $F \sim 0$ pN ne s'expliquerait pas, car la polymérase ne serait pas correctement positionnée par rapport à l'extrémité 3' de l'ARN.

Les quatre caractéristiques observées sont par contre compatibles avec l'hypothèse d'un dépliement partiel de la protéine sous l'action de la force. Les expériences de dépliement de protéines à l'échelle de la molécule unique, par application d'une force constitue un champ d'étude à part entière [108]. Les mesures de dépliement ont été effectuées essentiellement par Microscopie à Force Atomique (AFM) sur des protéines impliquées dans les mouvements intracellulaires, comme la titine [112]. Les forces nécessaires pour déplier les domaines protéiques sont dans ce cas de l'ordre de la centaine de pN et au-delà. Des expériences similaires sur des protéines non impliquées dans le mouvement [110] ont montré que ces protéines se dépliaient sous des forces plus petites : 25 à 35 pN pour la spectrine par exemple [111]. La force nécessaire de dépliement dépend donc de la nature de la protéine, mais aussi des points d'application de la force exercée [108], ainsi que de la vitesse de séparation V_s [109, 110]. Dans la configuration de notre expérience (en mode F constant), on se trouve à la limite $V_s = 0$: les forces de déploiements

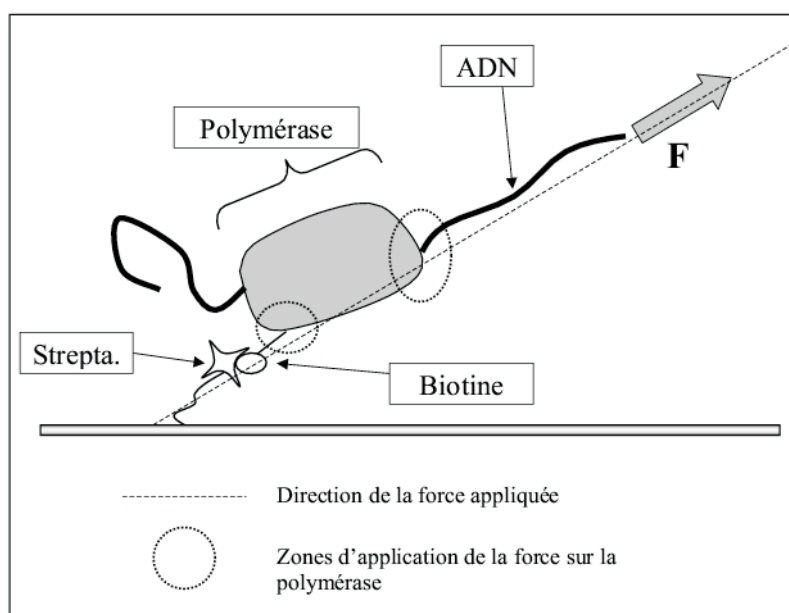


FIG. 5.16 – Points d'application de la force exercée sur la polymérase. À gauche, le point d'application est bien défini, c'est l'extrémité N-terminale de la polymérase. Un résidu de cette extrémité porte une biotine liée à la streptavidine présente sur le polymère qui recouvre la surface traitée (cf annexe 9.5). À droite, la zone d'application de la force est moins bien localisée; elle est partagée par les contacts que fait l'ADN avec la polymérase, essentiellement dans les domaines "doigts" et "pouce".

que l'on mesurerait dans une expérience où $V_s \neq 0$ seraient donc *plus grandes* que celles mesurées dans nos expériences. La structure et la fonction de l'ARN polymérase de T7 ne sont pas comparables à la titine composée de domaines identiques juxtaposés, et impliquée dans les mouvements intracellulaires. Elle est plus proche de la spectrine, composée d'amas d'hélices α . L'ordre de grandeur des forces de dépliements entre 5 et 20 pN mesurés sur la polymérase est compatible avec celui de 25-30 pN obtenu dans l'expérience de Rief et al. sur la spectrine [111].

L'ordre de grandeur de la longueur d'une chaîne peptidique est 0.35 à 0.40 nm par acide aminé; si l'allongement moyen de 48nm est associé à un dépliement complet d'une sous structure de la protéine, il correspond à l'étirement de ≈ 140 acides aminés (soit $\approx 15\%$ de la protéine). Quelles sont les points d'application de la force? La polymérase est attachée à la surface par l'extrémité N-terminale¹⁰, qui constitue donc un point d'application précis. Dans l'autre sens la force s'applique sur la polymérase, via l'ADN (cf figure 5.16).

A priori, la force est donc distribuée sur tous les contacts entre l'ADN et la polymérase (essentiellement les domaines "doigts" et "pouce", cf. 2.4.1). Il est difficile d'envisager un dépliement des domaines en contact avec l'ADN qui n'affecteraient pas directement la dissociation. Or le complexe ADN-protéine ne se dissocie pas après l'allongement. On en déduit que

¹⁰L'extrémité N-terminale est modifiée pour être allongée de 15 acides aminés dont un est biotinyllé (cf. annexe 9.2)

l'allongement correspond vraisemblablement au dépliement d'une partie du domaine N-terminal. Puisque la vitesse est nulle dans la plupart des cas après le dépliement, on émet l'hypothèse que ce dépliement inhibe la catalyse, sans modifier la dissociation. Pourtant, on trouve dans la littérature des expériences sur des polymérases modifiées par mutations ou délétions dans ce domaine qui montrent que leur processivité est peu affectée. Notre hypothèse est-elle contradictoire avec ces données ? Non, car un dépliement induit par une contrainte mécanique n'a pas forcément les mêmes effets que des mutations ou une délétion : le dépliement peut entraîner des changements de conformation dans les domaines proches alors que les mutations et délétions privent éventuellement la protéine d'une fonction essentielle mais ne provoquent pas de changement de conformation sur les domaines voisins. D'autre part, les expériences de mutagenèses laissent penser que des régions particulières du domaine N-terminal pourraient être impliquées dans la reconnaissance de sites de pause ou d'arrêt (cf 2.4.2 et 2.4.4) : le dépliement partiel supposé dans nos expériences pourrait-il provoquer un changement de conformation identique à celui induit par une séquence d'arrêt ? Les informations disponibles par les mesures de force ne sont pas suffisantes pour pouvoir l'affirmer. Cependant, les deux structures cristallographiques du complexe en élongation récemment publiées (cf 2.4.4) indiquent que des régions du domaine N-terminal ou proche de ce domaine qui subissent un important changement de conformation lors du passage à la phase d'élongation semblent impliquées dans le mécanisme de reconnaissance de sites de pauses ou d'arrêt. C'est notamment le cas de la région 150-200 (appelée "flap" ou sous-domaine H) et de la boucle de reconnaissance du promoteur, qui sont susceptibles d'être affectées par le dépliement partiel supposé.

Vitesses négatives

Certaines polymérases possèdent une activité *exonucléase*, qui leur permet d'inverser le sens de la polymérisation. Ce mode est favorisé par l'incorporation d'un "mauvais" nucléotide et participe ainsi à la correction d'erreur lors de la transcription. L'ARNPT7 n'est pas connue pour posséder cette activité. Sastry et Ross ont cependant observé une activité RNase chez l'ARNPT7, sur des complexes en élongation arrêtés par un cross-link sur l'ADN ou stoppés à l'extrémité 5' du brin codant [52]. Cette observation est indépendante de la pyrophosphorylation et lors de la phase d'élongation "normale", la polymérase ne montre pas d'activité exonucléase. Sastry et Ross n'ont pas montré si cette activité exonucléase s'accompagnait d'un mouvement de la polymérase. Huang et al. [29] ont eux aussi voulu tester l'existence d'une activité exonucléase. Pour ce faire, ils ont mis des complexes arrêtés par incorporation d'un 3'dNTP¹¹ en présence de 3'rNTP en excès : l'hypothèse est que si la polymérase présente une activité exonucléase, elle peut retirer le 3'dNTP et la chaîne d'ARN peut reprendre son extension. Les auteurs n'ont pas observés d'extension de la chaîne d'ARN. Mais aucune observation de ce type n'a été faite, contredisant le résultat de Sastry et Ross.

Dans nos expériences, des vitesses négatives ont parfois été mesurées. Parmi les transcriptions à 27°C, 37 "mouvements inversés" impliquant 20 polymérases ont été observés. Dans toutes ces expériences, des vitesses positives ont été mesurées avant et/ou après le mouvement en arrière,

¹¹Ces NTP ne portent pas le groupe -OH en 3' empêchant l'extension de la chaîne d'ARN.

assurant que l'enzyme était active. Quand elle est négative, la vitesse n'est corrélée à aucune autre valeur mesurée (concentration en NTP ou force de charge) : les vitesses les plus élevées sont même observées pour des faibles tensions. Dans la majorité des cas, c'est après une baisse de la force de charge ou une détente à zéro piconewton que l'enzyme repart de nouveau vers l'avant. Curieusement, ce sont les expériences où la concentration d'un ou plusieurs nucléotides est carencée par rapport aux autres espèces de nucléotides, dans lesquelles on observe le plus de mouvements en arrière (cf. tableau ci-dessous). Pour différencier mouvement en arrière et dérive dans l'instrumentation de la mesure, on sélectionne les vitesses supérieures ou égales à 8 b/s, mesurées pendant au moins 8 secondes ; il ne reste alors que 9 événements dont les caractéristiques sont rassemblées dans le tableau ci-dessous :

[NTP](μ M)	F(pN)	V(b/s)	t(s)	activité [§]
70	5	-9	10	+
3800	5.4	-18	8	-
40*	6.2	-10	12	+
40*	4.1	-11	9	+
40*	4.2	-18	11	-
40*	4.5	-32	11	+
38**	5	-10	19	-
150	4.1	-21	12	-
150	4.4	-21	9	+

[§] : indique si une vitesse positive a ensuite été mesurée (+) ou si le mouvement en arrière marquait la fin de la transcription (-).

* : concentration non homogène en NTP, $[ATP] = 590 \mu M$, $[CTP] = [UTP] = [GTP] = 30 \mu M$; le chiffre de $40 \mu M$ apparaissant dans la colonne de gauche est calculée en faisant la moyenne des inverses des concentrations de chaque NTP. Cela suppose une relation linéaire entre l'inverse de la vitesse et l'inverse de la concentration (cf. 2.2.2).

** : idem mais avec $[UTP] = 10 \mu M$, $[CTP] = [ATP] = [GTP] = 590 \mu M$

Les mouvements en arrière sont donc rares et difficiles à caractériser mais ils sont observés. Une autre preuve est apportée par l'unique expérience qu'il a été possible de réaliser à 37°C (voir aussi page 107) : dans cette courte expérience, la validité des mesures de vitesses négatives ne fait pas de doute car (i) aucune dérive globale du niveau de force n'est observée, et des dérives temporaires sont peu probables dans la mesure où les étirements ont été réalisés de chaque côté du point d'ancrage¹², (ii) les vitesses négatives sont importantes et des pauses (V très proche de zéro) ont été aussi observées (cf. figure 5.26).

¹²D'un côté du point d'ancrage le signal mesuré correspondant à la force est positif et il est négatif de l'autre (cf. 4.1.2) : une dérive continue du niveau de force a donc tendance à faire surestimer la vitesse d'un côté du point d'ancrage et à la faire sous-estimer de l'autre.

[NTP](μ M)	F(pN)	V(b/s)	t(s)	activité
150	5	-56	3	+
150	8	-16	6	+

Ce qui est surprenant dans cette expérience, c'est le mouvement vers l'avant retrouvé sans baisse de force ou détente à force nulle (cf. figure 5.26).

Les mouvements en arrière mesurés pourraient correspondre à une activité exonucléase. En effet, l'enzyme est capable de redémarrer, ce qui suggère éventuellement que l'extrémité 3' de l'ARN est correctement positionnée par rapport au site catalytique. Des expériences ultérieures sur l'ARNPT7 devraient apporter de nouvelles informations sur l'existence ou non de cette activité.

5.2 Résultats et analyses des expériences

Pour cette étude, trois niveaux de force ont été privilégiés : 5, 11 et 15.5 pN ; et quatre concentrations en nucléotides : 30, 70, 150, et 590 μ M, pour chaque NTP¹³. Par la suite, par "XX μ M NTP", on entend : XX μ M pour chacun des quatre NTP, sauf précision explicite. Dans ces expériences de mesure de force menées à 27°C, la polymérase peut transcrire plusieurs milliers de bases sous contrainte mécanique, à des vitesses allant jusqu'à la centaine de bases par secondes ; une même enzyme peut donc transcrire sous contrainte mécanique plusieurs minutes.

On montrera comment on peut mettre en évidence des étapes limitantes couplées ou non au mouvement de la polymérase vers l'avant en variant la force, les concentrations en NTP et en ions magnésium. On présentera également les différentes influences que peuvent avoir sur la vitesse de transcription et le comportement de l'enzyme la concentration en sel et la température.

Dans la configuration utilisée, une force appliquée via l'ADN s'oppose au mouvement vers l'avant de la polymérase. A chaque cycle d'incorporation, la polymérase doit alors fournir un travail pour se déplacer sur l'ADN. En conséquence, l'application de la force doit ralentir la ou les étapes liées au mouvement vers l'avant. Ce mouvement s'accompagne d'une réduction de longueur d'ADN entre la polymérase et la bille ; plus précisément, la variation de longueur que l'on détecte dans notre expérience est en fait la variation de la distance entre le domaine N-terminal (où est localisé le point d'attachement à la surface) et la bille.

On suppose implicitement ci-dessus que (i) la structure de la polymérase n'est pas affectée par l'application de la force et que (ii) les étapes qui ne sont pas liées à ce mouvement d'avancée sont très peu sensibles à la force appliquée.

On rappelle de plus que la structure locale de l'ADN double brin est très peu modifiée par la force exercée (cf. discussion sur l'équation 5.1.1).

¹³Les concentrations théoriques utilisées sont en fait respectivement 29, 73, 147 et 588 μ M

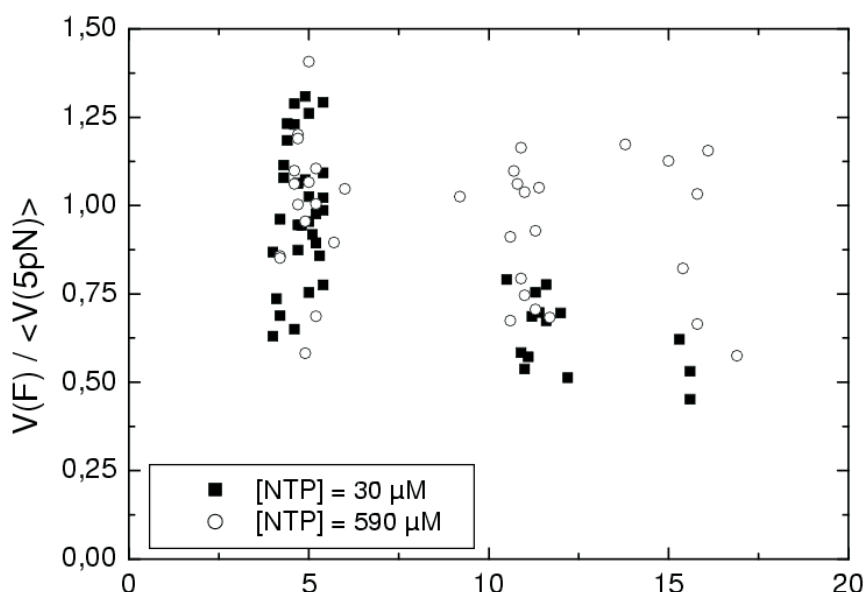


FIG. 5.17 – Vitesse relative $V / \langle V(5\text{pN}) \rangle$ pour $[NTP]=30\text{ }\mu\text{M}$ (■) et $[NTP]=590\text{ }\mu\text{M}$ (○), en fonction de la force. Pour $[NTP]=30\text{ }\mu\text{M}$, $\langle V(5\text{pN}) \rangle \simeq 26\text{ b/s}$ (33 points, 11 enzymes) et pour $[NTP]=590\text{ }\mu\text{M}$ $\langle V(5\text{pN}) \rangle \simeq 106\text{ b/s}$ (16 points, 7 enzymes). Chaque point représente une mesure de vitesse sur une enzyme et plusieurs points peuvent provenir d'une même enzyme (pour $[NTP]=590\text{ }\mu\text{M}$: 18 enzymes, 36 points; pour $[NTP]=30$: 23 enzymes, 37 points et pour $F \simeq 15\text{ pN}$, les trois points sont obtenus avec trois enzymes différentes).

5.2.1 Mise en évidence d'une étape liée au mouvement

On peut observer la dépendance de la vitesse à la force sur une même enzyme en faisant varier les niveaux de force pendant une expérience. Pour caractériser le comportement moyen, il faut accumuler un grand nombre de mesures. Comme on a pu le voir sur les figures 5.9 et 5.10, la force a peu d'influence dans la gamme 5-20 pN, et pour les concentrations utilisées (respectivement 150 et 590 μM). Cependant, même s'il reste faible, l'effet de la force est plus important à basse concentration en NTP. On le montre sur la figure 5.17 où l'on compare pour $[NTP]=30\text{ }\mu\text{M}$ et $[NTP]=590\text{ }\mu\text{M}$ les baisses relatives de vitesse en fonction de la force.

Cette tendance est confirmée avec les autres concentrations : en passant de 5 à 15 pN, la vitesse moyenne baisse respectivement de 8, 23, 31 et 46 % pour $[NTP]=590, 150, 70$ et $30\text{ }\mu\text{M}$. **Ces résultats montrent que les faibles concentrations en NTP font apparaître une étape limitante couplée à la force, donc à un travail de l'enzyme dans la direction d'application de la contrainte mécanique.**

Effet de la force en fonction de la concentration en NTP

On montre maintenant de façon plus détaillée comment une baisse de la concentration en NTP fait apparaître une étape limitante couplée à la force. Nous dégagerons un des résultats centraux de notre travail. On s'interroge aussi sur la cinétique de la réaction, et notamment on

vérifie si elle est du type Michaelis-Menten (cf. 2.2.2).

La configuration de l'expérience ne permet pas de tracer la courbe $V([NTP])$, à force fixée, pour une même enzyme, car il est difficile de varier la concentration en NTP en cours d'expérience, en faisant les mesures sur une même protéine. Une courbe représentant la dépendance entre la vitesse et la concentration en NTP fait donc nécessairement intervenir des moyennes de vitesses obtenues sur plusieurs polymérases. Pour présenter les résultats, on choisit de représenter $1/V$ en fonction de $1/[NTP]$ (cf 2.2.2). Dans le calcul de la moyenne de $1/V$, les faibles vitesses prennent une grande importance par rapport aux autres. Une sélection des données s'avère donc nécessaire : pour chaque couple de conditions ($[NTP]$, force), on a calculé la valeur moyenne de l'inverse de la vitesse, en excluant 20% des points de façon à ce que les 80% restants soient dans le plus petit intervalle possible. Après la sélection, il reste 189 points obtenus sur 48 enzymes différentes, pour un temps total de transcription de 1 h 18 min (dont ~ 50 min au premier niveau de force, ~ 20 min au deuxième et ~ 7 au troisième). Le tableau suivant indique pour chaque couple de condition ($[NTP]$, force) le nombre d'enzymes et le nombre de données qui ont servis à établir les moyennes :

[NTP] (μM)	Force (pN)	enzymes	points	$\langle 1/V \rangle$ (s/b)	ESM
30	5	11	33	0.039	0.001
30	11	9	11	0.057	0.003
30	15.5	3	3	0.070	0.006
70	5	11	25	0.025	0.001
70	11	9	18	0.031	0.001
70	15.5	4	5	0.037	0.006
150	5	17	30	0.016	0.001
150	11	11	21	0.019	0.001
150	15.5	5	7	0.021	0.001
590	5	7	16	0.0094	0.0006
590	11	6	13	0.0102	0.0006
590	15.5	5	7	0.0103	0.0012

A chaque point correspond une détermination indépendante de vitesse de transcription. ESM : erreur sur la moyenne, définie dans l'annexe 9.8.

Pour les trois niveaux de force considérés, les moyennes obtenues sont placées sur la figure 5.18.

Dans cette représentation, une réaction du type Michaelis-Menten conduit à une relation linéaire : la droite coupe l'axe des ordonnées en $1/V = 1/V_M$, et la pente correspond au rapport K_m/V_M . Pour $[NTP] \geq 70 \mu\text{M}$, on obtient bien des droites, mais un effet non michaelien apparaît entre 30 et 70 μM . Cet effet sera détaillé dans un paragraphe ultérieur page 98. Dans le domaine $70 \leq [NTP] \leq 590$ on obtient, pour chaque niveau de force, les valeurs de V_M et de K_m suivantes par trois régressions linéaires indépendantes (la force est donnée en pN, K_m/V_M en s. $\mu\text{M}/\text{b}$, V_M en b/s et K_m en μM) :

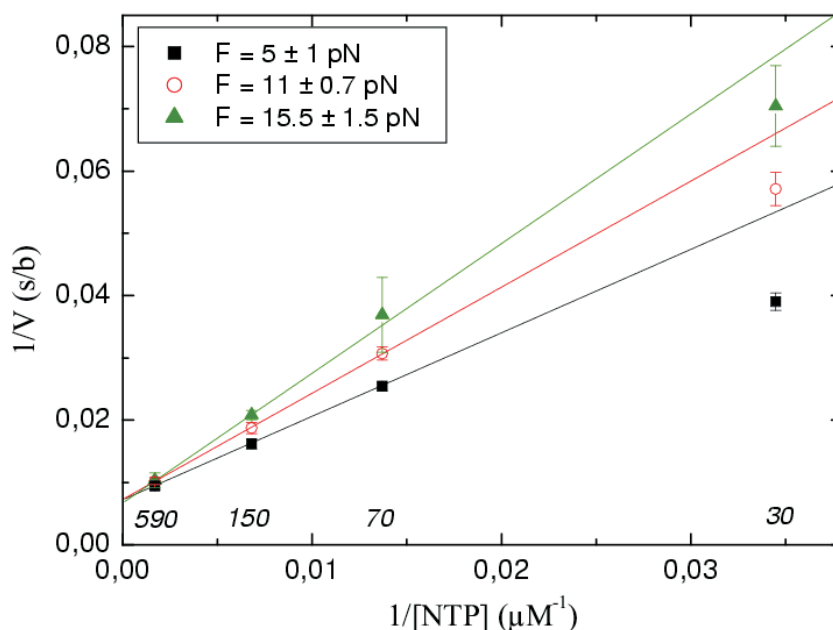


FIG. 5.18 – $1/V$ en fonction de $1/[NTP]$ à différentes forces : 5 ± 1 pN (■), 11 ± 0.7 pN (○), et 15.5 ± 1.5 pN (▲). Les points correspondent (de gauche à droite) aux concentrations suivantes : 590, 150, 70, $30 \mu M$ (indiqué sur la figure). Les droites représentent les régressions linéaires effectuées pour chaque niveau de force en ne prenant pas en compte les points à $30 \mu M$. La procédure pour obtenir la moyenne de $1/V$ à une force et une concentration donnée est indiquée dans le texte.

F	V_M	K_m/V_M	K_m
0	136	1.01 ± 0.15	140
5	139	1.34	186
12	137	1.7	236
15.5	149	2.08	288

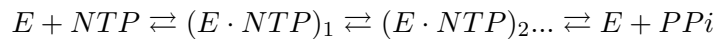
pour $F=0$ pN, K_m/V_M et V_M sont obtenus en effectuant une extrapolation linéaire d'après les résultats à $F \neq 0$.

K_m est simplement déduit des valeurs de K_m/V_M et V_M données dans le tableau.

Le K_m moyen mesuré par Arnold et al. [79] est de $55 \mu M$. Les K_m obtenus d'après les mesures de force sont donc plus élevés. On remarque qu'il existe cependant un facteur 2 entre les résultats de Guajardo et ceux d'Arnold (cf 2.2.4). Les conditions de l'expérience, ainsi que le contexte de séquence jouent sûrement un rôle important pour la valeur de ce paramètre.

Le V_M mesuré *in vitro* et *in vivo* (cf 2.2.4) vaut ≈ 240 b/s à $37^\circ C$. Si l'on tient compte d'une baisse d'activité de l'ordre d'un facteur 2 entre 35 et $25^\circ C$ (cf. paragraphe consacré à l'influence de la température page 107), on estime alors la vitesse à $27^\circ C$ à ≈ 120 b/s. Les valeurs obtenues dans nos expériences sont en accord avec cette estimation.

Les deux paramètres de l'équation de Michaelis (K_m et V_M), obtenus en extrapolant à force nulle nos résultats expérimentaux sur molécule unique, sont donc compatibles avec ceux établis précédemment grâce aux expériences d'enzymologie. Comment ces paramètres varient avec la force appliquée, et plus précisément quelle est la signification du réseau de droites de la figure 5.18? Dans le cas d'une réaction à un substrat, on peut décrire le cycle d'incorporation par le schéma général suivant :



La première étape correspond à la fixation du nucléotide dans le site actif de la polymérase. Les étapes suivantes menant aux différents états $(E \cdot NTP)_i$ décrivent des changements de conformations éventuels de la polymérase. La fin du cycle correspond à l'étape d'hydrolyse du nucléotide conduisant à l'incorporation du NTP dans la chaîne d'ARN, puis à l'éjection d'un pyrophosphate (PPi). Dans ce schéma global, la première étape est d'autant plus lente (défavorable) que la concentration en nucléotide est faible : l'étape de rencontre entre le nucléotide et le site actif de la polymérase est limitante pour $[NTP]$ petit. Quand la concentration en $[NTP]$ est saturante, cette première étape devient très rapide : c'est donc les étapes suivantes incluant l'hydrolyse qui sont limitantes pour $[NTP]$ grand. Pour mettre en évidence l'étape qui dépend de la force, il faut se placer dans les conditions où celle-ci est limitante (l'étape limitante impose la vitesse de transcription, et on suppose que l'étape liée au mouvement de la polymérase vers l'avant est celle qui dépend de la force de charge).

On vérifie sur la figure 5.18 que ce sont les basses concentrations où l'effet de la force est le plus important. Quand la concentration en NTP augmente l'effet tend à disparaître. Les résultats montrent donc que $1/V_M$ (l'ordonnée à l'origine) ne semble pas dépendre de la force dans la gamme 5-15 pN : la plus grande variation est observée entre $1/V_M$ (11 pN) et $1/V_M$ (15.5 pN), et elle n'est que de 8 %. Au contraire, le rapport K_m/V_M (le pente des droites) augmente de 27 % entre 5 et 11 pN et de 55 % entre 5 et 15.5 pN. Une interprétation simple peut être faite à partir de ces résultats :

1. $1/V_M$ représente la limite du temps d'incorporation quand $1/[NTP] \rightarrow 0$, i.e. dans des conditions où *ce temps est uniquement donné par les étapes suivant la liaison du nucléotide dans le site actif*, la rencontre NTP-polymérase n'étant pas limitante. Comme ce temps ne dépend pas de la force expérimentalement, la première étape de la réaction doit induire un mouvement vers l'avant.
2. pour $[NTP]$ petit :

$$\lim_{([NTP] \rightarrow 0)} V = \lim_{([NTP] \rightarrow 0)} \frac{V_M}{1 + K_m/[NTP]} \sim \frac{V_M}{K_m} [NTP]$$

A basse concentration, la vitesse est donc proportionnelle à V_M/K_m . K_m/V_M est très dépendant de F dans nos résultats, et traduit le fait qu'expérimentalement la vitesse dépend de la force à basse concentration : l'étape limitante à basse concentration est couplée à un mouvement vers l'avant. Or, quand $[NTP] \rightarrow 0$, c'est la première étape qui devient limitante.

Ces observations sont compatibles avec une avancée de la polymérase lors de la fixation du NTP dans le site actif.

Si l'avancée avait lieu *après* la liaison du nucléotide dans le site catalytique, on devrait observer les effets inverses¹⁴ :

(i) l'effet de la force sur la vitesse devrait être prépondérant pour [NTP] grand, et s'estomper pour [NTP] petit.

(ii) V_M (qui dépend entre autre de l'étape d'hydrolyse) devrait dépendre de la force, alors que K_m/V_M devrait peu ou pas varier.

Si on effectue maintenant les régressions linéaires en imposant V_M comme paramètre constant, on obtient les valeurs suivantes des paramètres de Michaelis :

- $V_M = 140 \pm 9$
- $K_m(5) = 186 \pm 19$
- $K_m(11) = 240 \pm 23$
- $K_m(15.5) = 281 \pm 30$

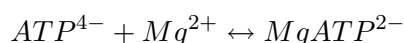
Les régressions linéaires ont été effectuées en affectant à chaque point un poids donné par l'inverse du carré de l'erreur sur la moyenne, et en excluant les données à 30 μM .

Sur la figure 5.19, on trace le logarithme népérien de K_m en fonction de la force imposée. Ajuster une droite passant par les trois points revient à exprimer K_m sous la forme d'une exponentielle. L'argument de l'exponentielle peut se mettre sous la forme : Fd/kT , où d est une distance caractéristique. Ici, la pente de la droite est 0.040 pN^{-1} ; prenant $kT \simeq 4.1 \text{ pN.nm}$, on en déduit : $d \simeq 0.16 \text{ nm}$, soit à peu près la moitié de la distance inter-base. On reviendra sur ce résultat de manière plus approfondie dans le paragraphe 5.3.2, et on montrera comment on peut introduire des distances caractéristiques d'une base et d'une demi-base dans différents modèles.

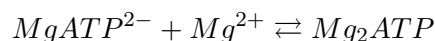
Effet de la concentration en Mg^{2+}

On a vu (partie 2.4.1) que la catalyse de la polymérisation nécessitait un cofacteur : l'ion magnésium, et le processus d'hydrolyse est supposé faire intervenir deux ions Mg^{2+} .

En solution, les espèces ioniques interagissent et peuvent s'associer. Les mesures des constantes de dissociation permettent de prédire quelle proportion d'une espèce peut réagir avec une autre. Notamment un NTP (qui porte 4 charges négatives) peut s'associer à un ion monovalent ou divalent. Dans les conditions standards de transcription à 37°C , la constante de dissociation K_D mesurée pour la réaction :



est $K_D \approx 30 \mu\text{M}$ [8]. La réaction :



¹⁴Keller et Bustamante [93] ont fait une interprétation détaillée concernant les figures attendues dans la représentation $1/V - 1/[\text{NTP}]$ en fonction de la place dans le cycle de l'étape couplée au mouvement.

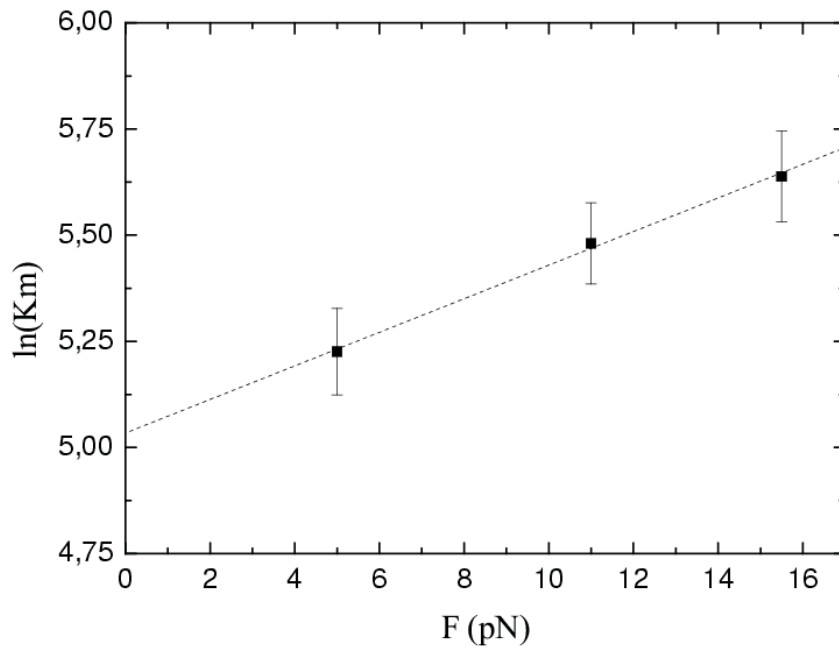


FIG. 5.19 – $\ln(K_m)$ en fonction de la force appliquée. L'ajustement d'une droite revient à considérer que $K_m(F)$ peut s'écrire sous la forme : $K_m(0) \cdot \exp(Fd/kT)$ où d est une distance caractéristique qui vaut $\simeq 0.16$ nm, i.e. une demi-base, et $K_m(0) \simeq 150$ μ M.

présente une constante de dissociation plus grande de trois ordres de grandeur : $K_D \approx 25$ mM [8]. Les réactions faisant intervenir d'autres espèces chimiques ont un K_D élevé (par exemple avec K^+ : $K_D \approx 70$ mM), ou bien font intervenir des espèces trop peu concentrées pour être prises en compte (c'est le cas des H^+ , dont le K_D avec les NTP n'est que ≈ 90 μ M, mais qui sont minoritaires à $pH \approx 8$). On peut donc calculer approximativement les concentrations d'ions magnésium libres, de NTP libres et de NTP associés à un ion magnésium ; *dans ce paragraphe, on note respectivement ces trois concentrations : $[Mg]_{libre}$, $[NTP]_{libre}$ et $[Mg \cdot NTP]$. On note $[Mg]_{tot}$ et $[NTP]_{tot}$, les concentrations totales introduites au départ. On a donc :*

$$\begin{aligned} [NTP]_{libre} + [Mg \cdot NTP] &= [NTP]_{tot} \\ [Mg]_{libre} + [Mg \cdot NTP] &= [Mg]_{tot} \end{aligned}$$

On ne tient compte que du K_D de la réaction entre le Mg et le NTP (on néglige les autres réactions, avec le KGlu, le H^+ , le Li^+ , etc...). Le tableau suivant donne les résultats pour les concentrations utilisées dans les expériences.

$[Mg]_{tot}$ (mM)	$[NTP]_{tot}$ (μ M)	$[Mg \cdot NTP]$ (μ M)
8	40	39.8
8	120	119.5
8	280	278.9
8	600	597.6
8	2360	2347

Les nombres calculés (colonne de droite) permettent de réaliser la proximité avec ceux de la colonne centrale : on voit que dans la mesure où les concentrations en magnésium et/ou NTP sont très supérieures à K_D , l'espèce la moins concentrée des deux réagit donc entièrement avec l'autre. Lors du cycle de transcription, il est donc probable que l'un des deux magnésiums nécessaires à la catalyse soit apporté par le NTP entrant. L'autre magnésium provient sans doute des ions restés libres en solution. Les NTP "piègent" les ions magnésium, et la concentration en magnésium peut donc devenir un facteur limitant du cycle d'incorporation ; et notamment lorsque la concentration $[Mg]_{tot}$ n'est pas largement supérieure à $[NTP]_{tot}$.

$[NTP]_{tot}$ (mM)	$[Mg]_{tot}$ (mM)	F (pN)	$\langle V \rangle$ (b/s)	N	t_{min} (s)
15.2	28	5	70 ± 11	5	9
15.2	28	11.5	91 ± 6	4	5
15.2	28	13.5	(84)	1	2
7.2	22	5.5	103 ± 13	7	9
7.2	22	11.5	(155)	1	6
7.2	22	14	104 ± 7	3	3
15.2	15	5	16 ± 3	5	10
15.2	15	11.5	23 ± 5	3	12
6.8	8.5	5	50 ± 4	11	9
6.8	8.5	11	51 ± 4	9	10
6.8	8.5	16	47 ± 5	3	11
2.4	8	5	106 ± 6	16	9
2.4	8	11	98 ± 6	13	9
2.4	8	15.5	97 ± 11	7	9
15.6	8	$\forall F$	pas de tr.*	-	-

Résultats obtenus pour différentes concentrations en NTP et magnésium. N indique le nombre de points pris en compte après la sélection de 80% des inverses de vitesse constituant le plus petit intervalle possible. t_{min} est le temps minimum de transcription pour chaque condition.

* : pour $[NTP]_{tot}=15.6$ mM et $[Mg]_{tot}=8$ mM, aucune transcription n'a été observée.

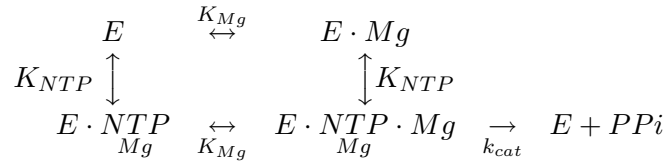
Afin d'étudier l'influence du magnésium dans le processus d'élongation, on a mesuré des vitesses de transcription, à différentes concentrations en $[NTP]_{tot}$ et $[Mg^{2+}]_{tot}$, pour des niveaux de force variables. On s'est placé à des concentrations en NTP au dessus du K_m , pour que la vitesse de transcription ne soit limitée que par la concentration en magnésium et non par une

trop faible concentration en nucléotides. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessus et discuté par la suite.

Influence de la concentration en magnésium à 5 pN.

Les premières observations (illustrées sur la figure 5.20) que l'on peut faire sont les suivantes : (i) pour une concentration en NTP donnée, la vitesse augmente avec la concentration en Mg (expériences à 15.2 mM NTP, et 6.8-7.2 mM NTP) ; (ii) pour une concentration donnée de Mg, la vitesse de transcription diminue lorsque l'on augmente la concentration en NTP (expériences à 8-8.5 mM Mg) ; (iii) la concentration en magnésium représente l'ordre de grandeur de la concentration en nucléotides au delà de laquelle la polymérase n'avance plus (expériences à 8-8.5 mM Mg et expériences à 15.2-15.6 mM NTP). Les remarques (i) et (iii) sont en accord avec les résultats obtenus par Lykke-Andersen et Christiansen [11] qui ont observé une influence de $[Mg^{2+}]$ sur la vitesse d'incorporation, pour des polymérases sauvages et modifiées dans la partie C-terminale.

On peut modéliser le cycle d'incorporation par un processus à deux substrats (le NTP complexé à un ion Mg^{2+} et l'ion Mg^{2+} provenant des ions libres en solution) :



K_{NTP} et K_{Mg} désignent les constantes de dissociation pour les deux substrats. Le schéma correspond au cas où les substrats, qui se lient à la polymérase dans des sites différents, *n'interfèrent pas entre eux*¹⁵. On montre alors que la vitesse de transcription V vérifie [83] :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_M} \left(1 + \frac{K_{NTP}}{[NTP]} + \frac{K_{Mg}}{[Mg]} + \frac{K_{NTP} \cdot K_{Mg}}{[NTP] \cdot [Mg]} \right)$$

Pour une concentration en NTP donnée, la droite représentant $1/V$ en fonction de $1/Mg$ coupe l'axe des abscisses en $(-1/K_{Mg})$. A chaque concentration en NTP est associée une droite. Dans les expériences menées en variant la concentration en ions magnésium, on a utilisé des concentrations saturantes en NTP de façon à ce que la vitesse de transcription ne dépende que très peu de $[NTP]$ et soit donc proche du V_M . Dans ces conditions, si on porte les inverses des vitesses mesurées en fonction des inverses des concentrations en ions magnésium libres¹⁶, les points mesurés appartiennent approximativement à une même droite. On porte les valeurs sur la figure 5.21 ; on ajoute aussi les valeurs obtenues à des niveaux de forces supérieurs à 5 pN car la force de charge a peu (ou pas) d'effet sur la vitesse, comme on va le voir dans le paragraphe suivant.

¹⁵La liaison d'un substrat dans son site ne modifie pas l'affinité de l'autre substrat pour son site

¹⁶On estime la concentration en magnésium libre à partir de la valeur du K_D de la réaction entre magnésium et nucléotide (cf. tableau page 91 par exemple).

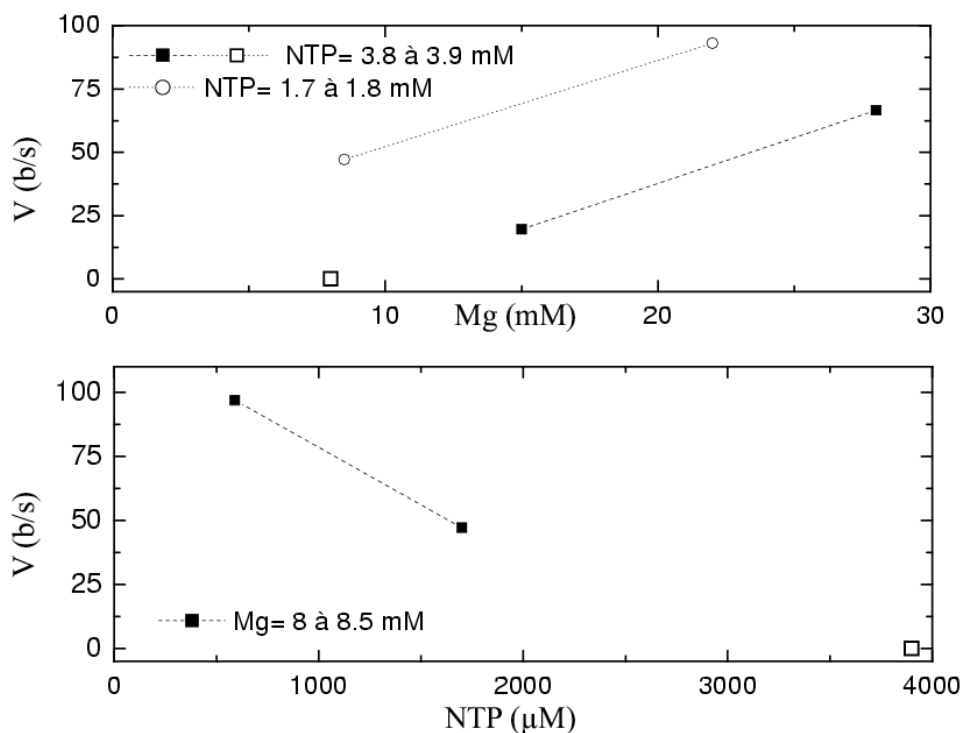


FIG. 5.20 – Vitesse en fonction de $[Mg]_{tot}$ à $[NTP]_{tot}$ fixée (en haut), et vitesse en fonction de $[NTP]_{tot}$ à $[Mg]_{tot}$ fixée (en bas). Deux expériences à $[Mg^{2+}]_{tot}=8$ mM et $[NTP]_{tot}=15.6$ mM n'ont donnée aucun événement de transcription, suggérant que ces conditions ne permettent pas à l'enzyme d'être active; le point correspondant a été ajouté (\square) : sur la figure du haut, pour $[NTP]_{tot} \approx 15.2-15.6$ mM, il indique que la concentration limite en magnésium au dessous de laquelle la polymérase est inactive est comprise entre 8 et 15 mM; sur la figure du bas, il indique que pour $[Mg^{2+}]_{tot} \sim 8$ mM, la concentration limite en $[NTP]_{tot}$ au delà de laquelle la polymérase est inactive est comprise entre 6.8 et 15.6 mM.

D'après la régression linéaire effectuée sur les résultats (cf figure 5.21, on estime : $K_{Mg} = 3.0 \pm 0.8$ mM. Young et al. [80] ont mesuré : $K_{Mg} = 2.1 \pm 1.6$ mM et Woody et al. [16] : $K_{Mg} \approx 2$ mM. Le résultat obtenu sur molécule unique est donc cohérent avec les mesures classiques "en volume". Les expériences à plus basses concentrations en NTP (de 30 à 600 μ M) dont les résultats ont été présentés dans le paragraphe précédent ont été menées avec $[Mg]_{tot} = 8$ mM. Si on applique le schéma réactionnel précédent à deux substrats sur les données de la figure 5.18, en imposant $K_{Mg} = 3$ mM¹⁷, on obtient les même K_{NTP} et on obtient $V_M \simeq 200$ b/s contre $\simeq 150$ b/s si on considère un processus à un substrat. Le K_m des NTP reste donc inchangé conformément à l'hypothèse de non-interférence entre les sites des deux substrats, et la vitesse maximale augmente de $\sim 30\%$. La prise en compte de la concentration en Mg n'est donc pas déterminante dans la description de la cinétique tant que l'on a $[Mg]_{tot} = 8$ mM et $[NTP] \lesssim 600$

¹⁷Dans le cas du mécanisme à deux substrats, on suppose que K_{Mg} ne dépend pas de la force, hypothèse bientôt justifiée. De plus, la concentration en $[Mg]_{libre}$ a été fixée arbitrairement à 7.3 mM, valeur intermédiaire entre les valeurs de $[Mg]_{libre}$ à 30 et 590 μ M $[NTP]$ chaque.

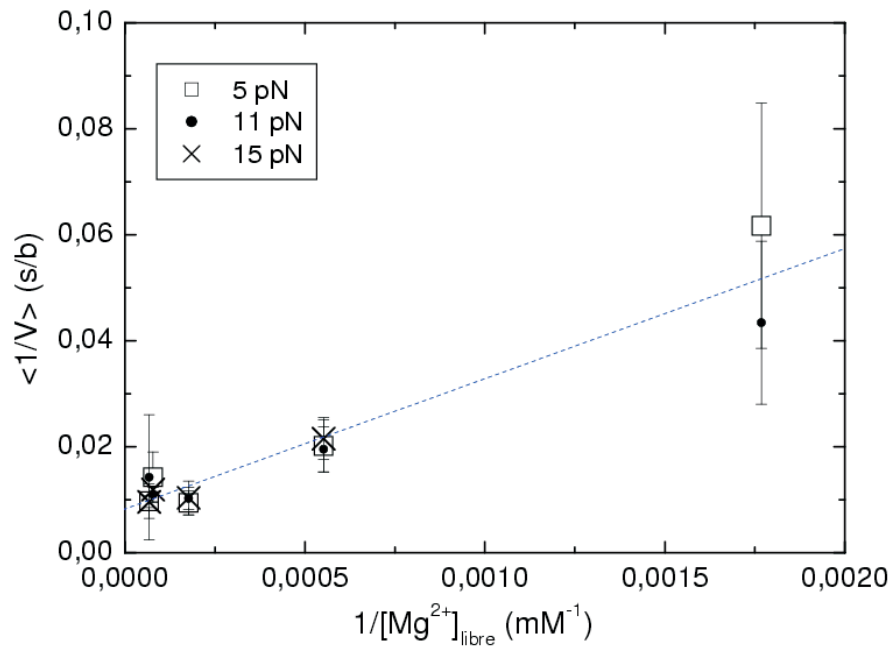


FIG. 5.21 – Inverse de la vitesse fonction de l'inverse de $[Mg^{2+}]_{libre}$, à différents niveaux de force. Dans tous les cas, la concentration en NTP n'est jamais limitante : elle est toujours $> 600 \mu M$, afin d'attribuer la baisse de vitesse à la concentration en Mg^{2+}_{libre} . La droite en pointillés est le résultat d'une régression linéaire.

μM .

Influence de la force

Pour les différentes concentrations en $[Mg]_{tot}$ et $[NTP]_{tot}$, la vitesse de transcription a été mesurée en fonction de la force de charge. Dans tous les cas de figure ($[NTP] \geq 590 \mu M$ chaque, et $8 mM < [Mg]_{tot} < 28 mM$) on n'observe pas de dépendance à la force. Pour illustrer ce résultat, on représente la moyenne du rapport $V(F)/\langle V(5pN) \rangle$ dans les conditions $[NTP]_{tot} = 6.8 mM$ et $[Mg^{2+}]_{tot} = 8 mM$. On choisit ces conditions car ce sont celles où l'on a le plus de points, et ce sont des conditions où une étape est rendue limitante (car la vitesse moyenne est faible : $\simeq 50$ b/s). Pour faire une comparaison, on porte sur la même figure les rapports obtenus dans les conditions : $([NTP]_{tot}, [Mg^{2+}]_{tot}) = (2.4 \mu M, 8 mM)$ et $(120 \mu M; 8 mM)$ dont les données brutes ont déjà été portées sur la figure 5.17. Une carence en magnésium fait donc apparaître une étape limitante puisque la vitesse est réduite par cette carence, mais on voit sur la figure 5.22 que cette étape n'est pas sensible à la force¹⁸

Conclusion

Cette série d'expériences permet de proposer :

1. l'élongation est sensible à la concentration en Mg^{2+} : un des ions magnésium présent dans

¹⁸On justifie donc *a posteriori* la non-dépendance présumée de K_{Mg} à la force (cf. note précédente).

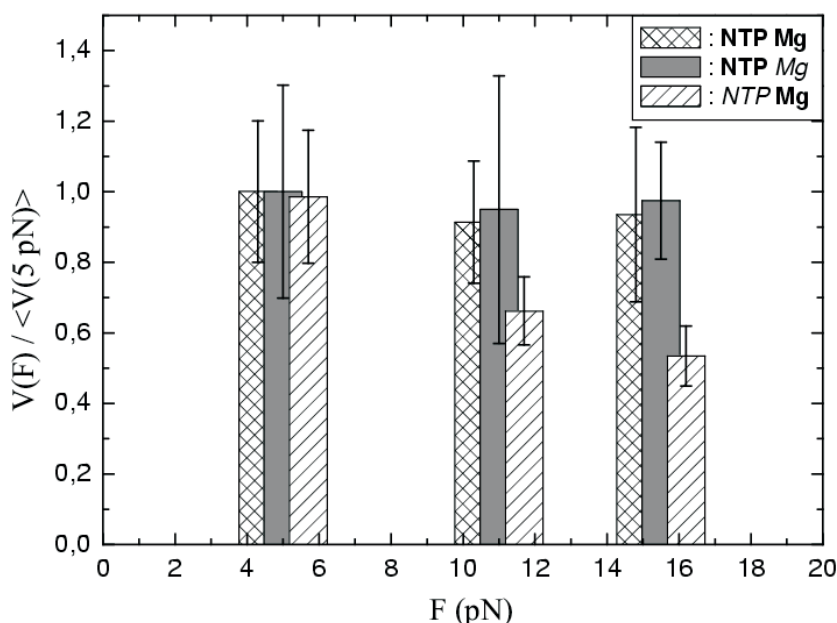


FIG. 5.22 – Les barres représentent la moyenne du rapport $V(F) / \langle V(5 \text{ pN}) \rangle$, pour trois conditions différentes : (i) $[NTP]$ et $[Mg^{2+}]$ ne sont pas limitants ($590 \mu\text{M}$ chaque NTP, 8 mM Mg^{2+} ; hachuré croisé), (ii) $[Mg^{2+}]$ est limitant, mais pas $[NTP]$ (1.7 mM chaque NTP i.e. 6.8 mM NTP_{tot} , 8 mM Mg^{2+} ; grisé), (iii) $[NTP]$ est limitant, mais pas $[Mg^{2+}]$ ($30 \mu\text{M}$ chaque NTP, 8 mM Mg^{2+} ; hachuré simple). En insert, les concentrations limitantes sont symboliquement en italique et les concentrations **saturantes** en gras. La vitesse ne dépend de la force que dans le cas où la concentration en NTP est limitante.

le site actif est issu des ions libres en solution, l'autre est apporté par le NTP entrant. En première approximation, chaque NTP réagit avec un ion Mg^{2+} en solution.

- le cycle peut être décrit par un mécanisme à deux substrats (NTP et Mg^{2+}) qui n'interfèrent pas entre eux ; K_{Mg} est estimé à $\sim 3 \text{ mM}$, ordre de grandeur compatible avec ceux mesurés "en volume".
- lorsque la concentration en magnésium limite l'avancée de la polymérase, l'effet de la force, dans la gamme 4-17 pN, s'il existe, n'est pas mesurable avec le dispositif expérimental actuel : **la réduction de magnésium fait apparaître une étape limitante qui n'est pas couplée au mouvement de la polymérase vers l'avant.**

Quelle est cette étape ? Sait-on quelle influence peut avoir le magnésium sur la liaison des NTP dans le site actif et sur l'hydrolyse des NTP ? D'après la structure et le modèle supposé d'incorporation des NTP, la présence d'ions métalliques est requise pour effectuer l'hydrolyse du NTP en écrantant des charges négatives et permettre un état transitoire pentacovalent du phosphate, état identifié comme essentiel pour la catalyse. Dans le modèle de catalyse à deux ions illustré sur la figure 2.9 page 27, l'ion A interagit prioritairement avec l'extrémité 3'-OH de l'ARN et favorise la liaison phosphodiester, l'ion B est proche des phosphates β et γ du NTP entrant et favorise l'éjection du PPi. Le magnésium supposé être apporté par le NTP est vraisemblablement

l'ion B, l'ion A provenant alors des Mg^{2+} libres en solution. C'est le rôle de l'ion A provenant du magnésium libre en solution qui est mis en évidence par la diminution en Mg total. On propose l'hypothèse que l'étape de catalyse est dépendante de la concentration des ions métalliques, beaucoup plus que ne peut l'être l'étape de fixation du NTP dans le site actif. Les résultats montrent que *la diminution de la concentration en magnésium rend limitante(s) une ou plusieurs étapes liée(s) à la catalyse (un changement de conformation nécessaire, la liaison phosphodiester elle-même ou l'éjection du PPi), elle s'accompagne donc d'une baisse de la vitesse de transcription; cette vitesse ne dépend pas de la force, suggérant que cette(ces) étape(s) n'est(sont) pas liée(s) à l'avancée de la polymérase sur l'ADN, résultat en accord avec la proposition que l'étape d'avancée a lieu lors de la fixation du NTP dans le site actif.*

Conclusion sur l'étape d'avancée de la polymérase

Les données que l'on vient de décrire permettent donc de proposer l'étape de fixation du nucléotide dans le site actif comme l'étape associée au mouvement de la polymérase vers l'avant. Cette hypothèse est aussi suggérée par différentes expériences menées par ailleurs. En utilisant des protéines fixées à divers endroits sur l'ADN et bloquant l'avancée de la polymérase, Guajardo et al. ont mis en évidence un accroissement du K_m durant la phase d'initiation [41]. Cette observation est compatible avec un mouvement vers l'avant stabilisé par la fixation du nucléotide. En effet, durant la phase d'initiation, la polymérase reste liée au promoteur en avançant et en comprimant l'ADN (cf partie 2.2.3) : le mouvement vers l'avant devient donc de plus en plus difficile pour la polymérase au fur et à mesure de l'avancée sur l'ADN. Une étude de Huang et Sousa [36] montre aussi que la position sur l'ADN de la polymérase arrêtée dépend de la présence ou non du prochain nucléotide à incorporer. Ces résultats ont été obtenus sur des complexes arrêtés en élongation par l'incorporation d'un 3'dNTP¹⁹, par digestion de l'ADN par des endonucléases et analyse sur gel d'électrophorèse. L'expérience est cependant délicate à interpréter car les résultats sont très dépendants de la concentration en endonucléase. Mais il apparaît toutefois que la présence de nucléotides favorise un déplacement de l'empreinte de la polymérase sur l'ADN de une ou deux bases suivant les expériences.

Dans la partie 5.3.2, on cherchera à exploiter les résultats obtenus par mesure de force afin de proposer des schémas réactionnels compatibles avec les données.

Nous revenons tout d'abord sur l'effet "non Michaelien" observé à basse concentration en NTP, puis sur l'influence de la concentration saline et de la température.

¹⁹L'incorporation suivante est impossible car il manque le groupement -OH à l'extrémité 3' de l'ARN nécessaire à la liaison phosphodiester.

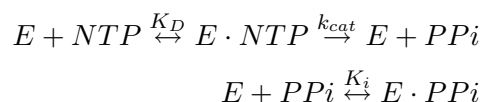
5.2.2 Effet non Michaelien

Nous abordons maintenant les résultats à "faible" concentration en NTP ($< 70 \mu\text{M}$). Comment expliquer l'effet non michaelien observé sur la figure 5.18 ? Une erreur sur la concentration en NTP est-elle en cause ? Pendant la purification des complexes arrêtés par centrifugation sur gradient de sucrose (détaillé en annexe 9.3.2 et 9.3.3), il se peut qu'une partie des nucléotides introduits à haute concentration lors de l'initiation ne soient pas éliminés ; une partie pourraient se retrouver déposés dans l'échantillon faussant l'estimation de la concentration lors de la mesure. La vitesse, plus élevée qu'attendue, à basse concentration en NTP ajoutés pourrait s'expliquer ainsi. Pour tester cette hypothèse, trois centrifugations dans les conditions identiques à l'expérience ont été réalisées avec des nucléotides marqués au ^{33}P . Les résultats (cf. annexe page 164) montrent que la concentration de chacun des trois nucléotides introduits pour l'initiation est au final dans le puits $< 0.5 \mu\text{M}$. L'hypothèse de la "fuite" ne semble donc pas s'appliquer.

On étudie maintenant d'autres raisons (non liées aux méthodes expérimentales utilisées) qui pourraient expliquer l'effet non michaelien à basse concentration : (i) l'influence que peut avoir la concentration locale de PPI, et (ii) l'existence de deux états de l'enzyme, dépendant de la concentration totale en NTP.

Influence de la concentration en PPI

Dans les notions d'enzymologie exposées au 2.2.2, on a négligé la concentration des pyrophosphates. La concentration totale des PPI est en effet négligeable, mais la concentration locale autour de la polymérase peut être différente si la diffusion des PPI n'est pas assez rapide : les pyrophosphates produits lors de l'hydrolyse de chaque nucléotide incorporé pourrait dans ce cas interagir avec la polymérase, et jouer le rôle d'inhibiteur compétitif, i.e. pouvoir entrer momentanément dans le site actif à la place des nucléotides. La possibilité d'inverser la réaction par pyrophosphorylation est difficile à prendre en compte, car on ne connaît pas la constante de réaction qui permettrait à la polymérase d'éjecter le NMP dernièrement incorporé. La constante n'est pas nulle, mais elle est en tout cas trop petite pour fournir une contribution à la correction d'erreur [29]. Pour simplifier, on suppose tout d'abord que le pyrophosphate ne joue qu'un rôle d'inhibiteur compétitif ; le système est alors décrit par deux réactions en compétition :



Une concentration en PPI élevée peut "ralentir" la polymérase. Cette concentration étant directement liée à la vitesse de transcription (un pyrophosphate relargué par nucléotide incorporé), l'effet non michaelien observé pourrait s'expliquer ainsi : à haute concentration en NTP, la polymérase se déplace rapidement (proche du V_M) mais produit beaucoup de pyrophosphates qui atténuent la vitesse en jouant leur rôle d'inhibiteur ; à basse concentration en NTP, la vitesse

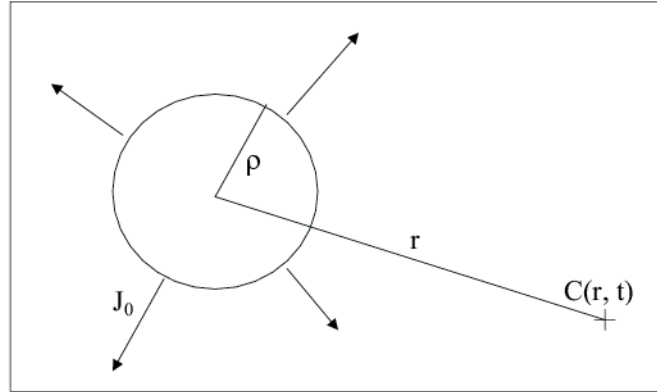


FIG. 5.23 – Modélisation pour estimer la concentration locale en PPi autour de l'enzyme. La polymérase est représentée par la sphère de rayon ρ ; les pyrophosphates sont émis avec un débit J_0 (un PPi émis à chaque incorporation de nucléotide dans le chaîne d'ARN). On cherche la concentration en pyrophosphate à la position r à l'instant t .

réduite s'accompagne d'un plus faible "débit" de pyrophosphates, qui ne peuvent plus intervenir comme inhibiteur. L'importance du rôle joué par les pyrophosphates dépend de la façon dont ils diffusent dans la solution, en fonction de leur "débit".

Pour étudier ce problème, on fait l'analogie suivante : on considère une source sphérique de dimension ρ (la polymérase) qui envoie les PPi à débit constant J_0 (cf figure 5.23), et on cherche la distribution de PPi autour de la source au cours du temps.

En coordonnées sphériques, l'équation de diffusion des PPi à partir de la source est :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left[r^2 \frac{\partial c}{\partial r} \right]$$

où c est la concentration des PPi, r la distance au centre de la source et D le coefficient de diffusion des PPi. ρ et $t_{diff} = \rho^2/4D$ sont deux grandeurs caractéristiques du problème. On introduit deux variables sans dimension [73] : $\zeta = r/\rho$ et $\tau = 4Dt/\rho^2 = t/t_{diff}$. Une équation donne la concentration de PPi en fonction de la distance à la source et du temps :

$$C(\zeta, \tau) = \frac{J_0 \rho}{D} \Psi(\zeta, \tau)$$

où J_0 est le débit de PPi (molécules / $m^2.s$), et :

$$\Psi(\zeta, \tau) = \sqrt{\frac{\tau}{4\zeta^2}} \left\{ \frac{e^{-A^2} - e^{-B^2}}{\sqrt{\pi}} - A \cdot \text{erf}(A) + B \cdot \text{erfc}(B) \right\}$$

où erf et erfc sont respectivement la fonction erreur et son complément et sont définies par :

$$\begin{aligned} \text{erf}(x) &= \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-u^2} du \\ \text{erfc}(x) &= 1 - \text{erf}(x) \end{aligned} \quad (5.2.1)$$

Ces fonctions vérifient notamment : $erf(0) = 0$, $erf(\infty) = 1$ et $erf(-x) = -erf(x)$. A et B sont définis par :

$$A = \frac{\zeta - 1}{\sqrt{\tau}} \quad B = \frac{\zeta + 1}{\sqrt{\tau}}$$

On estime le coefficient de diffusion D avec la formule : $D = kT/\gamma$. $\gamma = 6\pi\eta a$ est le coefficient de friction de l'objet de dimension a . Prenant $a \approx 0.2$ nm, on obtient $D \simeq 10 \cdot 10^{-6}$ cm²/s. On peut vérifier la validité de cette estimation en encadrant le coefficient des PPI ($H_4P_2O_7$) obtenu par celui d'une molécule plus petite et celui d'une molécule plus grande. A 25°C, le coefficient de diffusion de l'ATP est environ $3.7 \cdot 10^{-6}$ cm²/s [82] et celui de petites molécules comme NaCl, KCl ou KBr est compris entre 14 et $19 \cdot 10^{-6}$ cm²/s [113]. L'ordre de grandeur choisi pour D_{PPI} est donc correct.

Dans le cas présent, le débit J_0 est proportionnel à la vitesse v de la polymérase et s'exprime par :

$$J_0 = \frac{v}{4\pi\rho^2}$$

Prenant $\rho = 5$ nm (l'ordre de grandeur du rayon de la polymérase), et $v \approx 100$ b/s, on trouve :

$$\frac{J_0\rho}{D} = \frac{v}{4\pi\rho D} \simeq 10 \mu m^{-3}$$

Le terme Ψ dépend théoriquement du temps, mais on peut vérifier qu'autour de la polymérase (dans un rayon de 10 nm) la valeur de Ψ atteint très rapidement (< 1 sec) sa limite stationnaire. On peut donc considérer qu'à tout moment dans nos expériences, l'état stationnaire est atteint. On calcule Ψ pour $t \gtrsim 1$ sec, $v = 100$ b/s, et $5 < r < 7$ nm, et on obtient alors : $[PPI] = C(\zeta, \tau)$ compris entre 11 et 16 molécules par μm^3 , c'est-à-dire : $[PPI] < 0.03 \mu M$.

Comment cette concentration intervient-elle dans l'expression de la vitesse ? La présence d'un inhibiteur compétitif modifie l'équation de Michaelis-Menten. Le K_m , lié à l'affinité des NTP pour le site actif de l'enzyme est modifié par la présence des pyrophosphates inhibiteurs : dans l'équation de Michaelis-Menten, K_m est remplacé par $K_m(1 + \frac{[PPI]}{K_i})$ où K_i désigne la constante de dissociation du complexe enzyme-pyrophosphate. La vitesse devient donc :

$$v = \frac{V_M}{1 + \frac{K_m}{[S]}(1 + \frac{[PPI]}{K_i})} \quad (5.2.2)$$

$K_i = 830 \pm 8 \mu M$ d'après Guajardo et Sousa [74], et $200 \mu M \pm 45$ pour Arnold et al. [79]. Chez l'ADNP d'*E. coli*, K_i est du même ordre de grandeur ($230 \mu M$) alors que le K_m n'est pas comparable (de l'ordre du μM) [21]. Les pyrophosphates jouent un rôle important dans la modification de la cinétique si $\frac{[PPI]}{K_i}$ est de l'ordre de 1. Avec $v \approx 100$ b/s, on obtient : $\frac{[PPI]}{K_i} \approx 1$ à $4 \cdot 10^{-4}$. On en déduit que les pyrophosphates entourant la polymérase ne jouent pas un rôle important dans la cinétique, et l'effet non michaelien ne peut donc pas leur être attribué.

La pyrophosphorylation peut-elle avoir une influence ? Si on considère une concentration en NTP de $600 \mu M$, et une concentration en PPI de $0.03 \mu M$, il y a autour de la polymérase²⁰ 1

²⁰Dans un rayon de 7 nm autour du centre de la sphère-polymérase de 10 nm de diamètre, d'après le calcul effectué plus haut.

pyrophosphate pour 20000 nucléotides. Même en supposant qu'une pyrophosphorylation soit équiprobable à une hydrolyse, un retour en arrière devrait être observé tous les 20 kb, ce qui ne peut pas modifier la vitesse de transcription. La pyrophosphorylation semble donc être négligeable dans ces conditions.

Mise en évidence de deux états dépendant de la concentration en NTP

Une déviation par rapport à la cinétique Michaelienne peut être la signature de l'existence de deux états, dépendants de la concentration en NTP (cf 2.2.2). Ce phénomène a été observé pour l'ARNP d'*E.coli* par Foster et al. [75], mais avec l'effet inverse : un accroissement de la pente de $1/V$ quand $1/[NTP]$ augmente. Les auteurs ont interprété les résultats en supposant l'existence d'un site allostérique proche du site actif ; l'occupation simultanée des deux sites (allostérique et actif) par deux nucléotides du même type ferait passer l'enzyme d'un état "défavorable" à un état "favorable". A basse concentration, la probabilité de remplir les deux sites simultanément diminue, et la polymérase resterait dans ces conditions dans un état "défavorable" (d'où un accroissement de la pente de $1/V$). Pour l'ARNPT7, l'explication n'est pas recevable car la pente diminue quand $1/[NTP]$ augmente : l'état "favorable" serait associé à la non-occupation du site allostérique.

On va montrer qu'effectuer des expériences en carençant un ou plusieurs nucléotides apporte des informations sur la nature des deux états (s'ils existent).

a) Dans un premier temps on considère qu'à chaque incorporation, les trois types de nucléotides en compétition avec le NTP à incorporer ne jouent aucun rôle d'inhibition. Que se passe-t-il si les concentrations des différents NTP ne sont pas identiques (i.e. si un ou plusieurs NTP sont carencés) ? On prend par exemple une concentration C_1 pour chacun de trois NTP (disons A, C et G) et C_2 pour le quatrième, avec $C_1 > C_2$. Quelle est la vitesse moyenne de l'enzyme sur une séquence quelconque ? On suppose que la polymérase passe un temps $t_1=1/v_1$ sur chaque base A, C ou G, et un temps $t_2=1/v_2$ sur chaque U, v_1 et v_2 désignant les vitesses d'incorporation. Sur les 24 premiers kb du λ , le pourcentage d'adénine sur 150 bases est de $23.5 \% \pm 4.2$ (sd) et de $23.5 \% \pm 2.5$ sur 1000 b. Sur les portions de séquences transcrites pendant une expérience (de l'ordre du kb), le pourcentage de chaque base est proche de 25%. On considère donc qu'une carence en un NTP a pour effet de ralentir l'incorporation d'une base sur quatre en moyenne. Un cycle d'incorporation dure donc en moyenne :

$$\left\langle \frac{1}{V} \right\rangle = \frac{1}{4} \left(\frac{3}{v_1} + \frac{1}{v_2} \right) \quad (5.2.3)$$

Deux séries d'expériences de ce type ont été réalisées, une première avec : $[ATP] = [CTP] = [GTP] = 590 \mu\text{M}$ et $[UTP] = 10 \mu\text{M}$; une seconde série dans les conditions : $[UTP] = [CTP] = [GTP] = 30 \mu\text{M}$ et $[ATP] = 590 \mu\text{M}$, dans les deux cas sous une contrainte de ~ 5 pN. De ces expériences, on extrait la moyenne $\langle 1/V \rangle$; si on suppose que la valeur moyenne de $1/v_1$ (associée à la concentration élevée) est donnée par les résultats des expériences sans carence, on peut théoriquement déterminer l'inverse de la vitesse à basse concentration $1/v_2$, en fonction de $\langle 1/V \rangle$ et $1/v_1$ en utilisant l'équation 5.2.3.

La première série d'expérience donne : $\langle 1/V \rangle = 0.040$ s ; la moyenne est obtenue sur 17 mesures de vitesse (6 polymérases) pour des temps de transcription supérieurs à 10 s pour chaque point, et pour un temps total de 14 min 21. On désigne par $V(C)$ la vitesse pour une concentration en nucléotide égale à C , exprimée en μM . Prenant $1/V(590) = 0.0094$ s (voir tableau page 87), on obtient :

$$\langle \frac{1}{V_{car}(10)} \rangle = 4 \langle \frac{1}{V} \rangle - 3 \frac{1}{V(590)} = 0.131s$$

L'indice $_{car}$ rappelle qu'il s'agit d'une vitesse obtenue dans des expériences où un ou plusieurs types de NTP sont carencés. Deux expériences avec $[NTP]=10 \mu\text{M}$ pour chaque NTP ont été menées. Les résultats n'apparaissent pas sur la figure 5.18 pour deux raisons : (i) pour une des deux expériences, la température n'était pas régulée à 27°C , mais à 22°C ; (ii) les mesures sont peu nombreuses : 2 polymérases pour 8 points à basse force (après la sélection des points décrite plus haut : $3.6 < F < 4.8pN$, temps total = 2 min). Néanmoins, il est instructif de comparer les résultats obtenus dans ces conditions avec celui obtenu dans l'expérience de carence. Des expériences à $[NTP]=10 \mu\text{M}$ pour chaque NTP, on tire : $\langle 1/V(10) \rangle = 0.072$ s, qui est presque de moitié inférieur (45 %) à la valeur obtenue ci-dessus.

Concernant la seconde série d'expérience ($A = 590 \mu\text{M}$; $C = G = U = 30 \mu\text{M}$), on obtient : $\langle 1/V \rangle = 0.036$ s (20 points, 12 polymérases, temps de transcription > 8 s, pour un temps total de 7 min 20, et $4 < F < 6.4$ pN). On a alors :

$$\langle \frac{1}{V_{car}(30)} \rangle = \frac{1}{3} (4 \langle \frac{1}{V} \rangle - \frac{1}{V(590)}) = 0.048s$$

Pour les expériences à $[NTP]=30 \mu\text{M}$ pour chaque NTP, le résultat était : $\langle 1/V(30) \rangle = 0.039$ s, qui est encore inférieur (de 19 %) à la valeur obtenue dans l'expérience de carence.

Si l'on ajoute les points obtenus à basses concentrations dans les expériences de carence à ceux obtenus à 5 pN pour $[NTP]=30, 70, 150$ et $590 \mu\text{M}$ sans carence, on obtient la figure 5.24 : on s'aperçoit que les deux points ajoutés se trouvent dans le prolongement de la droite décrivant le processus d'incorporation pour $[NTP] \geq 70 \mu\text{M}$. On ajoute aussi le point correspondant aux expériences à $[NTP]=10 \mu\text{M}$ pour chaque NTP, qui renforce l'idée de l'existence de deux états puisque ce point ne s'aligne pas avec les points aux hautes concentrations.

Ces expériences permettent de proposer une première interprétation pour le processus : il existe deux états qui dépendent uniquement de la concentration globale en NTP ; les domaines de concentration définissant les deux états sont déterminés par les deux parties de la courbe qui sont linéaires dans la représentation $1/V$ fonction de $1/[NTP]$ (nommés A pour les "hautes concentrations" et B pour les "basses concentrations" sur la figure 5.25). L'état haute concentration est atteint si la concentration totale en NTP est supérieure à $4 \times 70 = 280 \mu\text{M}$ (car l'effet non-michaelien apparaît pour $[NTP] < 70 \mu\text{M}$ chaque, sur la figure 5.18).

Dans la première série d'expériences de carence il y a trois nucléotides à $590 \mu\text{M}$ et le quatrième à $30 \mu\text{M}$, on a donc $[NTP]_{tot} = 3 \times 590 + 30 = 1800 \mu\text{M} > 280 \mu\text{M}$: l'enzyme est dans l'état A. Sa vitesse v_1 sur les séquences comprenant les trois bases à $590 \mu\text{M}$ chaque est donnée

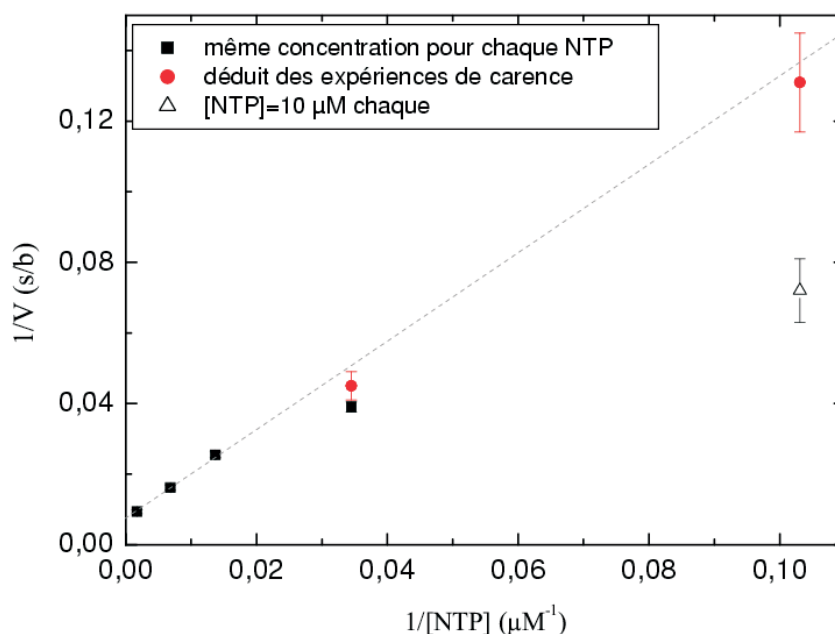


FIG. 5.24 – Inverse de la vitesse de transcription en fonction de l'inverse de la concentration en NTP, à 5 pN. Sont représentés sur la figure les résultats quand les concentrations des quatre nucléotides sont les mêmes (■) et les résultats des calculs effectués grâce aux mesures de vitesses dans les expériences de carences (●) ; on représente aussi le résultat obtenu sur deux expériences à $[NTP]=10 \mu\text{M}$ chaque (△), dont une était effectuée à 22°C . Les pointillés sont le résultat d'une régression linéaire qui prend en compte les trois ■ correspondant à $1/[NTP]<0.02$ et les deux ● ; ils indiquent que les résultats obtenus par les expériences de carence (●) se trouvent dans le prolongement de la droite décrivant la cinétique pour $1/[NTP]<0.02$.

par la courbe de la figure 5.25 pour $[NTP]=590 \mu\text{M}$ et la vitesse v_2 sur la quatrième base (le NTP carencé) est donnée par le prolongement de la droite correspondant à l'état A, pour $[NTP]=30 \mu\text{M}$. Dans la seconde série, on a : $[NTP]_{\text{tot}}=590 + 3 \times 30 = 680 \mu\text{M} > 280 \mu\text{M}$, l'enzyme est dans l'état A également.

Il reste une difficulté dans cette interprétation : on suppose d'une part que l'état de l'enzyme (qui détermine sa cinétique) dépend de la concentration totale en NTP, mais d'autre part on ne considère pas les nucléotides incorrects comme des inhibiteurs compétitifs²¹ (la vitesse d'incorporation d'un type de nucléotide est totalement indépendante des autres espèces de NTP, hypothèse de départ). Une possibilité d'interprétation est de supposer qu'il existe deux sites d'occupation : le site actif où la discrimination est quasi parfaite, et un second site pouvant accueillir n'importe quel type de nucléotide et dont l'occupation détermine l'état de l'enzyme.

b) On a supposé jusqu'ici que les nucléotides incorrects n'étaient pas des inhibiteurs compétitifs,

²¹Un inhibiteur compétitif a une affinité assez forte pour le site actif de l'enzyme pour prendre la place du substrat et ralentir ainsi la cinétique (l'étape de catalyse étant impossible avec l'inhibiteur). Lors de la transcription, les nucléotides analogues non-incorporables sont des inhibiteurs compétitifs.

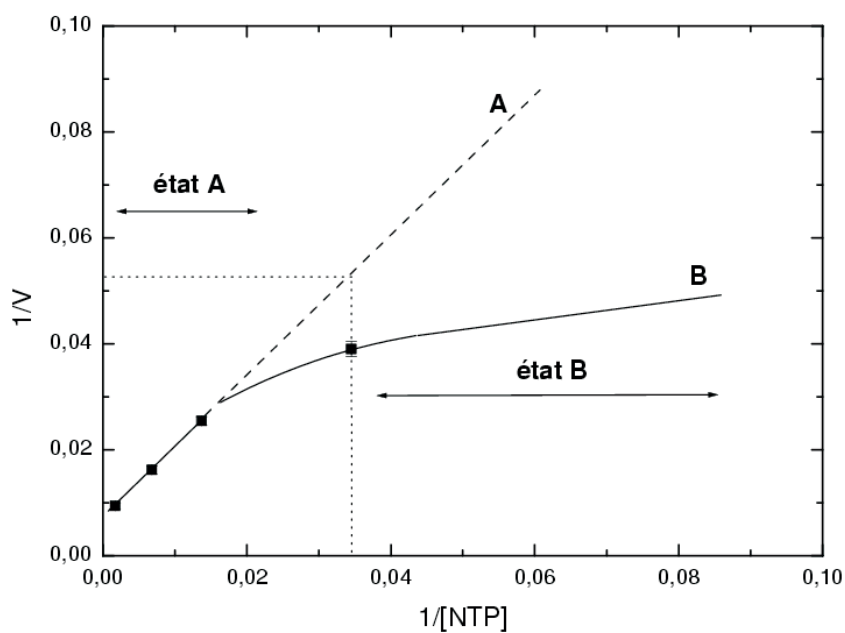


FIG. 5.25 – Illustration des deux états dépendants de la concentration totale en NTP. Les quatre points sont les résultats expérimentaux pour $F=5$ pN. Si la polymérase restait dans l'état A, les résultats seraient alignés sur la droite en pointillés ; les petits pointillés indiquent la vitesse pour $[NTP]=30 \mu M$ si la polymérase est dans l'état A.

mais qu'ils intervenaient uniquement dans la détermination de l'état de l'enzyme (haute ou basse concentration). On cherche maintenant une autre interprétation des résultats en considérant cette fois-ci que les trois espèces de "mauvais" NTP sont des inhibiteurs compétitifs²². On sait que dans ce cas l'expression de la vitesse est modifiée et prend la forme :

$$v = \frac{V_M}{1 + \frac{K_m}{[S]}(1 + \frac{[I]}{K_i})} \quad (5.2.4)$$

où S et I désignent respectivement les bons et mauvais nucléotides et K_i la constante de dissociation entre la polymérase et un mauvais NTP (on suppose cette constante indépendante de la nature du NTP). Dans le cas où les concentrations en NTP ne sont pas homogènes, on pose $[I] = \alpha[S]$; posant $K_m = \beta K_i$, on déduit facilement la forme suivante :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_M^{app}} + \frac{K_m^{app}}{V_M^{app}[S]} = \frac{1 + \alpha\beta}{V_M} + \frac{K_m}{V_M[S]} \quad (5.2.5)$$

V_M désigne ici la vitesse maximale d'incorporation d'un NTP *quand ce dernier n'est pas en compétition avec d'autres espèces de NTP* (i.e. si $\alpha=0$ ou $\beta=0$ ²³), et est donc différent du " V_M apparent" V_M^{app} qui est mesuré en présence des autres "NTP inhibiteurs". Dans le cas de concentrations homogènes en NTP ($\alpha=3$), le V_M^{app} (mesuré à ~ 140 b/s dans nos expériences) vaut : $V_M/(1 + 3\beta)$. De même, le K_m^{app} vaut : $K_m/(1 + 3\beta)$. Pour déterminer la vitesse sur une séquence comprenant $\sim 25\%$ de chaque bases quand la concentration en NTP n'est pas homogène, il faut calculer l'inverse de la vitesse d'incorporation de chaque espèce de NTP puis en effectuer la moyenne. Par exemple, dans la première série d'expérience avec $[UTP]=10\mu M$ et $[ATP]=[GTP]=[CTP]=590\mu M$, il faut calculer deux inverses de vitesses : $1/V_u$ et $1/V_{acg}$, avec pour l'incorporation d'un U : $[I]=\alpha_u[UTP]$ et pour l'incorporation d'un A, G ou C : $[I]=\alpha_{acg}[ATP]$, (ici $\alpha_u=177$ et $\alpha_{acg}=2$). Si le processus est Michaelien, les vitesses sont données par l'équation 5.2.5. Mais on suppose que ce n'est justement pas le cas ici ! On peut cependant exprimer les vitesses d'incorporations simplement, suivant le domaine de concentration (cf. figure 5.25) : dans chaque état, l'inverse de la vitesse est donnée par l'équation 5.2.5, mais suivant l'état de l'enzyme (A ou B), les constantes V_M et K_m sont différentes. Dans l'état A, elles sont données par les valeurs expérimentales obtenues à 5 pN pour $[NTP] \geq 70\mu M$: $V_M^{app}=140$ b/s et $K_m^{app}=186\mu M$. Dans l'état B, on détermine l'équation de droite avec les deux points expérimentaux à 10 et $30\mu M$.

L'inverse de la vitesse, dans la première série s'exprime donc par :

$$\left\langle \frac{1}{V} \right\rangle = \frac{1}{4} \left(\frac{3}{V_{acg}} + \frac{1}{V_u} \right)$$

avec :

$$\frac{1}{V_{acg}} = \frac{1 + \alpha_{acg}\beta}{V_M} + \frac{K_m}{590V_M}$$

et :

²²On suppose que l'affinité d'un nucléotide incorrect pour le site actif n'est pas négligeable, mais que son incorporation dans la chaîne d'ARN est impossible. Ceci est justifié par la bonne fidélité de la polymérase (cf 2.2.4)

²³Puisque $K_m = \beta K_i$, si $\beta=0$, simultanément $K_i \rightarrow \infty$ afin que K_m reste constant.

$$\frac{1}{V_u} = \frac{1 + \alpha_u \cdot \beta}{\tilde{V}_M} + \frac{\tilde{K}_m}{10\tilde{V}_M}$$

Connaissant $\langle 1/V \rangle$ par l'expérience, on en déduit une équation du second degré sur β qui n'admet qu'une solution positive : $\beta \sim 0.02$. Si on effectue le même calcul pour la seconde série d'expérience de carence, on obtient une seule solution positive : $\beta \sim 0.03$.

Ceci permet de donner une seconde interprétation aux résultats obtenus : il existe deux états, dépendant de la concentration du nucléotide à incorporer; la vitesse d'incorporation prend en compte les autres nucléotides qui sont des inhibiteurs avec une constante de dissociation K_i très élevée par rapport au K_m : $0.02 \lesssim K_m/K_i \lesssim 0.03$.

Dans la première interprétation, on pourrait supposer que le rapport K_m/K_i est non nul²⁴ : on s'aperçoit alors que dans les deux séries d'expériences de carences, β doit être encore plus petit qu'un centième (les calculs mènent à $\beta < 0$). On en déduit qu'il est impossible de trouver une interprétation des résultats dans laquelle la constante de dissociation K_i est proche du K_m ; cela suggère une grande discrimination de la part de la polymérase, dès la rencontre avec le nucléotide²⁵.

Dans la série d'expériences de carence avec $[UTP]=10 \mu M$, on a négligé l'influence que peuvent avoir la présence des $4-5 \mu M$ d'UDP non incorporable provenant du gradient de sucrose (voir les protocoles dans la partie 9.3.2 et page 157). De plus, une hypothèse importante a été faite dans tous ces traitements : la vitesse moyenne n'est pas supposée dépendre de la nature du NTP à incorporer. Or, on sait que le K_m est différent pour chaque NTP [74, 79]. Il est difficile d'estimer l'impact de ces différences dans les résultats obtenus ci-dessus. Ces derniers reposent donc sur certaines approximations (même K_m pour chaque NTP, séquences homogènes) et parfois sur un nombre limité d'expériences (pour $[NTP]=10 \mu M$ chaque), cependant il se dégage deux interprétations pouvant expliquer l'effet non-Michaelien observé expérimentalement :

1. L'enzyme existe sous deux états différents. L'état dépend de la concentration totale en NTP. Les nucléotides incorrects ne jouent aucun rôle d'inhibition (discrimination parfaite)
2. l'enzyme existe sous deux états différents. L'état est déterminé par la concentration du nucléotide à incorporer. Les NTP incorrects sont des inhibiteurs compétitifs et la constante de dissociation entre la polymérase et un NTP incorrect est supérieur au K_m de 2 ordres de grandeur.

Un corollaire important est :

quelque soit l'interprétation, le K_m est très faible devant la constante de dissociation entre la polymérase et un nucléotide incorrect.

²⁴Dans ce cas, les nucléotides incorrects joueraient un rôle d'inhibiteurs et la concentration totale en NTP déterminerait l'état de l'enzyme.

²⁵Dans l'hypothèse où les mauvais NTP sont des inhibiteurs du type analogues non-incorporables (i.e. avec une affinité proche de celle du NTP correct), on pose $K_i \simeq K_m$, i.e. $\beta \simeq 1$. Dans le cas de la première interprétation, les inverses de vitesses attendus dans les deux séries d'expériences, respectivement 0.188 s (8-9 b/s) et 0.065 s (15 b/s), sont alors loin des résultats expérimentaux : 0.040 s (25 b/s) et 0.036 s (28 b/s).

5.2.3 Autres effets

Effet de la concentration en Glutamate de Potassium (KGlu)

Les nucléotides utilisés sont issus de stocks concentrés à 100 mM chaque, dans une solution contenant également 100 mM d'ions lithium Li^+ . Les stocks sont dilués dans l'eau avant d'être utilisés. Au cours de l'expérience, lors de la mesure, la concentration en Li^+ dans l'échantillon est comprise entre 100 et 2500 μM ; elle est considérée comme négligeable devant les autres espèces ioniques : $[\text{Mg}^{2+}] = 8 \text{ mM}$, $[\text{KGlu}] = 25 \text{ mM}$ présentes dans la solution. On sait qu'une partie des interactions permettant de stabiliser le complexe ADN-polymérase est d'origine électrostatique (cf 2.4.1). La présence de sel doit écranter ces interactions et donc globalement déstabiliser le complexe. Cela a été vérifié indirectement par Maslak et al. [78]. Dans nos expériences, on observe une diminution de la dissociation en baissant la concentration en KGlu. Cette diminution s'observe par (i) des temps de transcription plus long, (ii) une résistance à des forces plus importantes ($>10 \text{ pN}$), (iii) des "cassures spontanée" (cassure de l'événement lors de la mise sous tension, attribuée à la dissociation entre l'enzyme et l'ADN) moins fréquentes. Mais il est difficile d'être quantitatif car d'autres changements pour améliorer les conditions de mesures ont eu lieu parallèlement.

Influence de la température

Dans la littérature, on trouve peu d'expériences réalisées dans le but d'étudier l'influence de la température sur la fonction enzymatique de la polymérase. Des mesures de l'*activité* de l'enzyme en fonction de la température ont été menées par Chamberlin et Ring [61] et par Oakley et al. [81]. Les résultats montrent une forte dépendance à la température : l'activité est multipliée par ~ 1.7 entre 20 et 25°C et entre 25 et 30, et par ~ 1.2 entre 30 et 35°C²⁶. Nous avons cherché à réaliser des expériences de transcription sous contrainte mécanique à 37°C. Malheureusement, la première constatation est que peu de complexes résistent à une force de charge, même petite. Il est impossible de savoir si c'est la polymérase qui lâche l'ADN, ou si c'est un attachement chimique (ADN sur bille par exemple) qui casse. Il est donc très difficile de mener ce type d'expérience à 37°C. Un seul événement de transcription a été observé. Le comportement de l'enzyme (en partie illustré par la figure 5.26) est différent, par certains aspects, du comportement moyen observé à 27°C :

1. la vitesse moyenne est plus grande, comme on pouvait l'attendre : pour $4.3 < F < 8.6 \text{ pN}$ et $\text{NTP} = 150 \mu\text{M}$ chacun, $\langle v \rangle = 145 \text{ b/s} \pm 30$ (6 points, de 2 à 7 s de transcription chacun), contre $62 \text{ b/s} \pm 15$ (30 points) à 27°C .
2. la vitesse n'est constante que sur des courtes périodes de temps inférieures à 10 s.
3. des pauses, voire des "retours en arrière" (effet discuté page 83) sont observés avec une fréquence plus importante qu'à 27°C.

²⁶Ces mesures de vitesse incluent la phase d'initiation très lente, mais l'utilisation de transcrits long rend cette étape courte devant le temps que met la polymérase pour parcourir la brin codant.

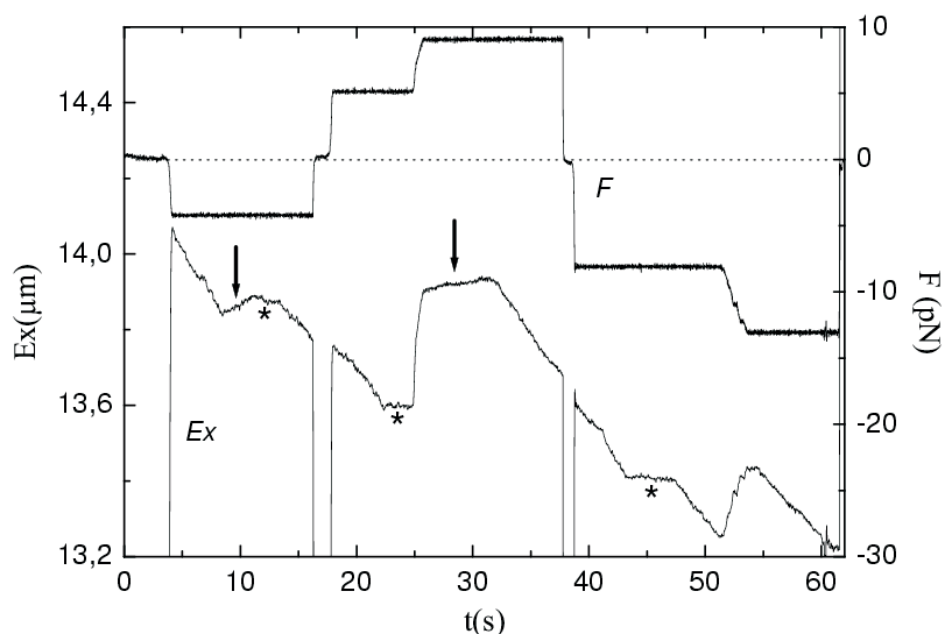


FIG. 5.26 – Extension (courbe du bas) et force (courbe du haut) en fonction du temps pour l'unique transcription à 37°C. Le changement de signe de la force indique de quel côté du point d'ancrage les étirements de l'ADN ont été effectués (cf 4.1.2). Les étoiles indiquent un signal s'apparentant à une pause ; les flèches indiquent les signaux correspondant à une vitesse négative.

Il me semble intéressant de noter ces caractéristiques particulières car, même si elles ne résultent que d'une expérience, elles n'ont jamais été observées pour des températures inférieures ou égale à 27°C.

D'après les résultats obtenus ici, la vitesse diminue d'un facteur 2.3 ± 0.3 entre 37°C et 25°C, ce qui est compatible avec le facteur de 2.0 entre l'activité à 25°C et à 35°C mesuré par Chamberlin et Ring, et Oakley et al. Cette baisse d'activité correspondrait essentiellement à une réduction de la vitesse moyenne de transcription.

Il est difficile de penser que les changements de régime de vitesse soient séquence-dépendant ; en effet, la vitesse n'est augmentée que d'un facteur deux par rapport à la valeur obtenue à 27°C (et donc le nombre de bases transcrites également) : de tels changements de vitesses devraient être observés à 27°C sur les enregistrements dont la durée est supérieurs à 10 ou 15s, ce qui n'est pas le cas.

Encore plus délicate est l'interprétation des "retours en arrière", qui sont difficilement imputables au système de mesure comme on l'a vu page 84.

La température agit donc sur la vitesse moyenne de transcription. Cependant les importants changements locaux de vitesse observés sur l'unique expérience à 37°C, indiquent que la température a très probablement une influence complexe.

5.3 Modèles moléculaires et théories

5.3.1 Concepts et définitions

L'implication des protéines dans les processus biologiques

Les protéines, dont le rôle est prédominant dans la plupart des processus biologiques, ne doivent pas être considérées comme des objets statiques. En particulier, leur action catalytique peut être liée à un changement dynamique de conformation. Dans certains cas, des parties articulées leur permettent des actions mécaniques couplées à des réactions chimiques. La forme d'une protéine peut aussi être modifiée par la liaison d'une autre molécule. Ce mécanisme peut être exploité par la cellule pour générer du mouvement ou réguler des réactions chimiques. Ce type de mécanisme permet ainsi aux protéines de fonctionner comme moteur, horloge (en introduisant un délai lors d'une réaction), facteur d'assemblage ou transport d'information [132]. Les protéines s'assemblent souvent pour former des grands complexes fonctionnant comme des machines : les mouvements coordonnés de chaque sous-unité permettent d'effectuer des tâches complexes dans l'espace et le temps.

Les changements de conformations dus à la liaison d'un ligand, ou associés à l'hydrolyse de l'ATP peuvent fournir de l'énergie aux "protéines moteurs", utilisée par exemple pour produire une force mécanique (pour les moteurs linéaires) ou un pompage d'ions à travers une membrane (pour les moteurs rotatifs). Les moteurs linéaires peuvent se déplacer sur un substrat composé d'unités assemblées périodiquement (comme les nucléotides de l'ADN). Ces unités déterminent en général le pas de la protéine-moteur. Chaque pas effectué est couplé à un certain nombre de changements de conformations et de réactions chimiques, dont l'hydrolyse de l'ATP²⁷. La réaction d'hydrolyse permet aux protéines de se mouvoir de façon unidirectionnelle : l'équilibre de la réaction est déplacé par la présence dans la cellule d'une quantité importante d'ATP, état métastable, par rapport aux produits dégradés plus stables ADP, AMP, Pi et P_{PPi}, de façon à rendre l'étape d'hydrolyse quasi-irréversible. Le principe de mouvement des moteurs rotatifs est le même que celui des moteurs linéaires : ils tournent de façon discontinue autour d'un axe, l'angle de rotation définissant leur pas, et le sens de rotation est déterminé par des réactions chimiques hors d'équilibre.

L'intérêt pour la modélisation des "moteurs moléculaires" est apparu à la suite des expériences récentes permettant d'observer des phénomènes biologiques à l'échelle de la molécule unique. Dans ces expériences, on arrive à mesurer les temps, distances et forces qui caractérisent le système. Malgré leurs diversités, les protéines moteurs partagent des caractéristiques fondamentales qu'il est tentant de décrire par un petit nombre d'hypothèses. Selon un point de vue théorique fréquemment adopté, un moteur moléculaire est décrit comme un objet microscopique se dirigeant de façon unidirectionnelle sur une structure périodique à une dimension. Cet objet subit des changements cycliques de conformations couplés à des réactions chimiques (liaison de molécules "fuel", rupture de liaison, dissociation) et des fluctuations thermiques rapides. Ces fluctuations (conformationnelles, chimiques, thermiques) auxquelles la protéine est soumise doivent être prises en compte dans la description du mouvement de la protéine.

²⁷Un grand nombre de protéine hydrolyse l'ATP, parfois le GTP. Les polymérases hydrolysent les quatre NTP.

"Brownian Ratchet" et "Power Stroke"

Une modélisation théorique rassemble des hypothèses décrivant le couplage entre les changements de conformations, les réactions chimiques, et le mouvement du moteur. Une question importante est de savoir quelle est la contribution des fluctuations thermiques dans le mouvement du moteur. Ainsi, deux modes de mouvements sont souvent opposés : le "Brownian Ratchet" (*cliquet brownien*) ou "Thermal Ratchet", et le "Power Stroke" (*marche forcée*). L'image associée au *cliquet brownien* est la suivante : le moteur est soumis aux fluctuations du bruit thermique et un mécanisme de "cliquet" permet de favoriser les fluctuations du mouvement dans une direction. C'est donc un mouvement dirigé, issu de la diffusion par mouvement brownien. La *marche forcée* désigne un mode de déplacement dans lequel un changement de conformation est directement couplé au mouvement. Dans le cas particulier de la transcription, Gelles et Landick [90] utilisent les deux termes pour caractériser deux modes de mouvements possibles d'une ARNP : (i) le "*cliquet brownien*" désigne essentiellement le modèle proposé par Guajardo et Sousa [74] (cf page 116) : la polymérase ayant incorporé le $n^{ième}$ nucléotide diffuse entre les positions n et $n + 1$; quand la polymérase se trouve à la position $n + 1$, la venue d'un nucléotide dans le site actif libre empêche le retour à la position n ; (ii) le modèle de la "*marche forcée*" correspond à une description plus classique : une partie de l'enzyme se fixe fortement sur l'ADN et un changement de conformation fait avancer le reste de la polymérase d'un pas. L'énergie nécessaire au changement de conformation pourrait être fournie lors de l'hydrolyse du NTP ($\simeq 12$ kT) à chaque cycle d'incorporation. Cependant on peut imaginer également ce mode d'avancée sans l'utilisation directe de l'énergie dégagée lors de l'hydrolyse : à la manière d'un autre moteur, la kinésine (cf. page 126), le changement de conformation pourrait être permis simplement par la fixation du nucléotide dans le site actif ; on peut imaginer également un changement de conformation induit par le relargage du pyrophosphate²⁸.

De manière générale, le *cliquet brownien* désigne donc un mode de mouvement nécessitant des fluctuations du bruit thermique, par opposition à la *marche forcée* qui ne les fait pas intervenir dans le travail effectué par le moteur : en l'absence de fluctuations, un moteur utilisant le mode de *marche forcée* fonctionne normalement.

Le mouvement brownien est-il une source d'énergie ?

Est-il possible d'utiliser les fluctuations thermiques seules pour produire un travail ? Non, car on pourrait fabriquer une machine perpétuelle, ce qui contredit le second principe de la thermodynamique. Feynman l'a exposé en imaginant le fonctionnement d'une roue à cliquet sous l'action des fluctuations thermiques²⁹, et dont le principe est illustré sur la figure 5.27. On peut montrer qu'un apport d'énergie extérieure est nécessaire pour produire un travail à l'aide du bruit brownien [88].

Les fluctuations thermiques peuvent donc intervenir dans le mouvement des moteurs moléculaires, mais elles ne peuvent pas à elles seules être responsables du mouvement dirigé. Astumian [87]

²⁸Un changement de conformation est observé chez les ADNP (cf. partie 2.4.1, *Les doigts*), mais on ne sait pas s'il est accompagné par un déplacement relatif de l'enzyme.

²⁹D'où le terme de Brownian Ratchet, bien que Feynman ne l'utilise à aucun moment dans son texte.

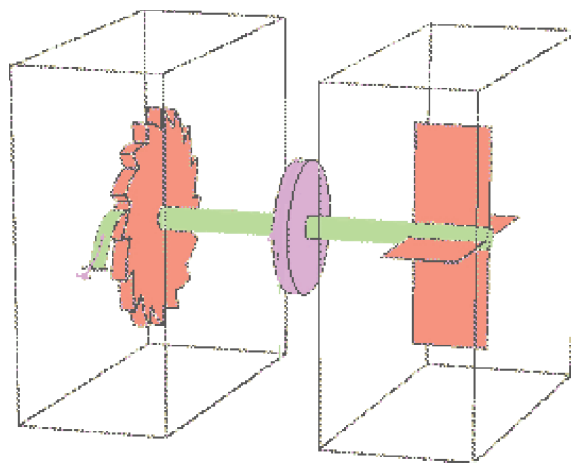


FIG. 5.27 – Les deux enceintes sont à la même température. A droite, la roue à aubes est soumise aux bombardements des particules du gaz qui la font tourner aléatoirement d'un côté ou de l'autre. A gauche, le sens de rotation de la roue est imposé par le cliquet. D'après cette analyse simple, on peut faire tourner la roue dans l'enceinte de gauche via les fluctuations thermiques dans l'enceinte de droite. On peut donc même exercer un travail pour soulever un objet. Ce mécanisme viole la seconde loi de la thermodynamique. En fait le raisonnement est faux : si les fluctuations dans l'enceinte de droite sont capables d'apporter l'énergie nécessaire à la roue à aube pour soulever le cliquet, alors celles de l'enceinte de gauche sont capables également de fournir la même énergie qui soulève le cliquet permettant alors à la roue de reculer. Pour effectivement observer un mouvement dirigé, il faut par exemple maintenir deux températures différentes dans chaque enceinte.

résume les trois ingrédients nécessaires : (i) le bruit thermique pour produire un mouvement Brownien, (ii) une anisotropie issue de la structure du milieu dans lequel le moteur diffuse et (iii) une réserve d'énergie provenant d'un agent extérieur (une réaction chimique hors d'équilibre par exemple).

Les échanges énergétiques pour un moteur Brownien isotherme³⁰, sont symbolisés sur la figure 5.28, issue de l'article de revue de Parrondo et de Cisneros [86] (les articles d'intérêt sur la théorie des moteurs Browniens sont référencés dans cette article). Un agent extérieur apporte l'énergie E_{in} ; le moteur utilise l'énergie sous forme d'un travail W contre la force de charge mécanique, et sous forme de chaleur Q libérée dans le thermostat. Les deux premiers principes de la thermodynamique s'écrivent :

$$E_{in} = W + Q$$

$$\Delta S_{agent} + \frac{Q}{T} = S_{prod} \geq 0$$

Où ΔS_{agent} est la variation d'entropie de l'agent extérieur et Q/T celle du moteur. Les deux principes permettent de déduire l'énergie maximale transformable en travail, i.e. l'énergie libre

³⁰Le moteur est immergé dans un milieu aqueux ; la diffusion thermique pour un objet nanométrique est rapide et le moteur fonctionne donc de façon isotherme.

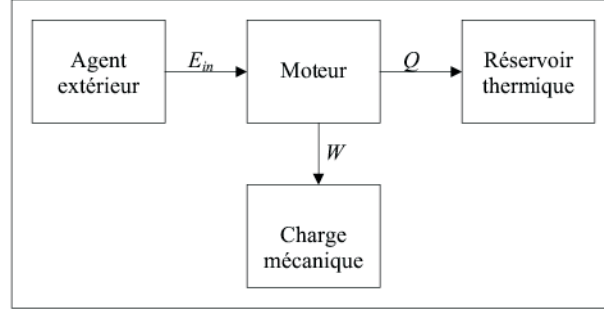


FIG. 5.28 – Echanges d'énergie pour un moteur brownien isotherme.

de Gibbs G_{in} , et l'efficacité du moteur η :

$$G_{in} = E_{in} + T\Delta S_{agent} \quad (5.3.1)$$

$$\eta = \frac{W}{G_{in}} = 1 - \frac{TS_{prod}}{G_{in}} \leq 1 \quad (5.3.2)$$

5.3.2 Modélisation

Les différentes stratégies de modélisation

Les modèles impliquant les fluctuations thermiques dans le mouvement du moteur décrivent la protéine comme une particule se déplaçant dans un potentiel et soumise à une force extérieure (la charge) ainsi qu'à une force aléatoire due aux fluctuations. Le mouvement d'une telle particule est décrit par l'équation de Langevin :

$$\dot{x}(t) = \frac{D}{kT}(-\partial_x V(x, t) + F + \xi(t))$$

où x est la position de la particule, \dot{x} sa vitesse, D est son coefficient de diffusion, $V(x, t)$ le potentiel qui peut être indépendant du temps, F est la charge et $\xi(t)$ la force aléatoire issue des fluctuations³¹.

Le potentiel $V(x, t)$ est supposé être périodique dans l'espace, la période correspondant au pas du moteur. Un exemple de moteur brownien simple et beaucoup étudié est le "Flashing Ratchet", développé par J. Prost. Dans ce modèle le potentiel est asymétrique et dépend du temps, il est périodique dans l'espace (pas nécessairement dans le temps) ; un agent extérieur est supposé assurer le passage d'une forme de potentiel à une autre (d'où l'idée d'un "flash")³². Dans l'équation de Langevin, $\partial_x V(x, t)$ est remplacé par $\zeta(t)\partial_x V(x)$, où $\zeta(t)$ est une fonction

³¹ $\xi(t)$ est un bruit blanc gaussien de moyenne nulle et dont la fonction d'auto-corrélation est donnée par : $\langle \xi(t)\xi(t') \rangle = (kT)^2 D^{-1} \delta(t - t')$.

³²Ce modèle peut être interprété comme un "moteur chimique" (Parrondo et de Cisneros [86]) : l'agent extérieur est une réaction chimique hors d'équilibre qui impose les "flashes" périodiques et le sens du mouvement. Tout particulièrement, les réactions du types : $E + F \rightarrow E + F'$, où E désigne le système étudié, F une particule "fuel" et F' , le fuel dégradé, décrivent le processus cyclique de transcription.

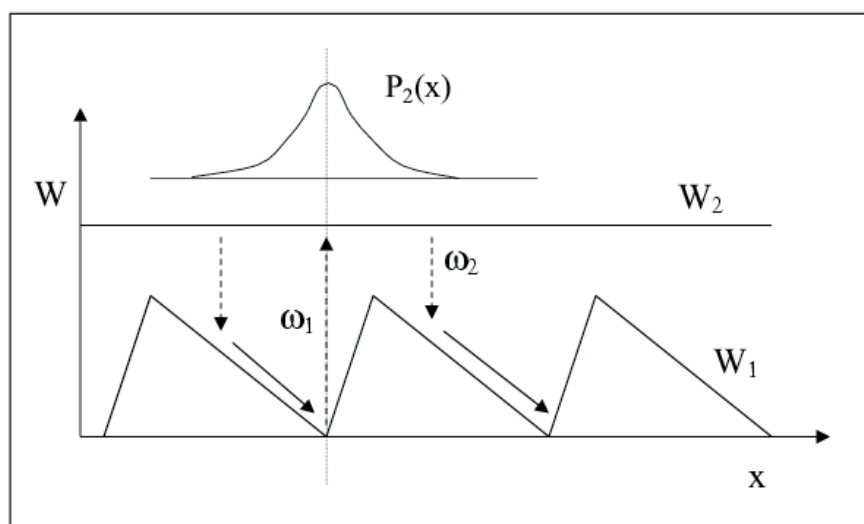


FIG. 5.29 – Potentiel issu de Jülicher et al. [92]. Le potentiel W_2 correspond à un état excité; la particule passe de W_1 à W_2 par la consommation de la particule "fuel" avec une fréquence moyenne ω_1 . Quand la particule est dans l'état excité, elle diffuse librement pendant un temps moyen ω_2^{-1} ; à chaque instant, la probabilité de trouver la particule à la position x est donnée par une gaussienne $P_2(x)$. La transition vers le potentiel W_1 s'effectue en moyenne à la fréquence ω_2 . L'anisotropie de W_1 favorise le déplacement de la particule dans un sens, la probabilité de faire un pas en arrière étant réduite par rapport à celle d'avancer ou de ne pas bouger. Les transitions $\omega_1 \leftrightarrow \omega_2$ sont décrites par la cinétique standard des réactions chimiques.

aléatoire du temps qui prend les valeurs 0 et 1. La figure 5.29 montre un exemple de potentiel étudié par Jülicher et al. [92]. Le potentiel W_2 correspond à un état excité; le moteur passe de W_1 à W_2 par la consommation de la particule "fuel". Quand le moteur est dans l'état excité, il diffuse librement pendant un temps moyen ω_2^{-1} avant de revenir au potentiel W_1 . L'anisotropie de W_1 favorise le déplacement de la particule dans un sens.

Certains modèles résument le cycle d'avancée à une seule étape : $n \leftrightarrow n + 1$ décrite par un équilibre chimique. Dans ce cadre et spécifiquement pour les ARNP, Jülicher et Bruinsma [94] ont étudié les effets d'une contrainte élastique interne à la polymérase. Ce traitement est permis par la simplification de la description du cycle d'incorporation en une seule étape. A partir d'un certain seuil, l'application d'une force a plus d'influence sur la structure de la protéine que sur la cinétique de la réaction : on ne connaît pas dans quelle mesure la protéine peut être déformée sous l'application d'une contrainte et comment cette déformation peut modifier le comportement de l'enzyme. Dans la plupart des modèles, on ne tient pas compte de cette possibilité, et on considère que la force n'agit que sur la réaction chimique couplée au mouvement.

Une autre approche consiste à établir un schéma réactionnel correspondant à un pas du moteur et de déterminer la valeur de la vitesse V en fonction des constantes de réaction, en supposant l'équilibre stationnaire ([101, 93, 64]). On détaille alors les étapes à l'intérieur du cycle. Suivant les constantes qui dépendent de la force F , on prédit, en fonction de la concentration

en molécule "fuel", les différentes formes que prend $V(F)$, ainsi que les constantes décrivant la cinétique ($K_m(F)$ et $V_M(F)$ dans le cas d'un processus Michaelien). Enfin, il est possible d'établir une description concrète en faisant des hypothèses sur le potentiel vu par le moteur au cours du cycle. C'est l'approche de Guajardo et Sousa [74] qui ont modélisé la translocation des polymérases. Ceci permet d'établir un schéma réactionnel précis, et de prédire les dépendances de la vitesse à la force et à la concentration en nucléotides. Ce modèle est développé dans le paragraphe suivant, car il est en partie compatible avec les résultats obtenus.

Il n'est pas toujours possible de vérifier la validité d'un modèle par l'expérience : les variabilités dans les mesures rendent difficile l'étude précise de l'influence de certains paramètres, des hypothèses différentes conduisent parfois à des conclusions similaires, le gamme de force est limitée : les prédictions ne sont donc pas toujours vérifiables, enfin, les limites techniques sont parfois un obstacle contraignant.

Dans la suite de ce chapitre consacré aux modèles théoriques, on traite le cas spécifique de l'ARNPT7, en prenant en compte les résultats expérimentaux obtenus par les mesures de forces.

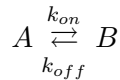
Cas d'un couplage fort entre avancée de la polymérase et fixation du NTP dans son site actif

Les résultats obtenus mettent en évidence un couplage entre le mouvement de l'enzyme vers l'avant et la venue du NTP dans son site actif (cf. figure 5.18). La vision la plus simple du phénomène est de considérer que l'avancée et la fixation sont *simultanées*, ce que l'on désigne par "couplage fort". Le cycle peut se mettre sous la forme suivante :



E_n désigne le complexe ADN-enzyme-ARN et l'indice n la position de la polymérase par rapport au brin codant. Si l'étape qui suit la fixation est lente devant la dissociation du complexe enzyme-NTP, i.e. si k_2 est petit devant $k_{-1}(F)$, alors la constante K_m s'exprime simplement comme le rapport entre $k_{-1}(F)$ et $k_1(F)$: le K_m représente la constante de dissociation entre la polymérase et le NTP entrant.

Quelle est l'expression qui relie K_m à la force de charge F ? On peut montrer [93] que pour une réaction du premier ordre :



l'application d'une force F modifie approximativement les constantes de réaction de la façon suivante :

$$k_{on}(F) = k_{on}(0)e^{-F\delta_1/kT}$$

$$k_{off}(F) = k_{off}(0)e^{+F\delta_2/kT}$$

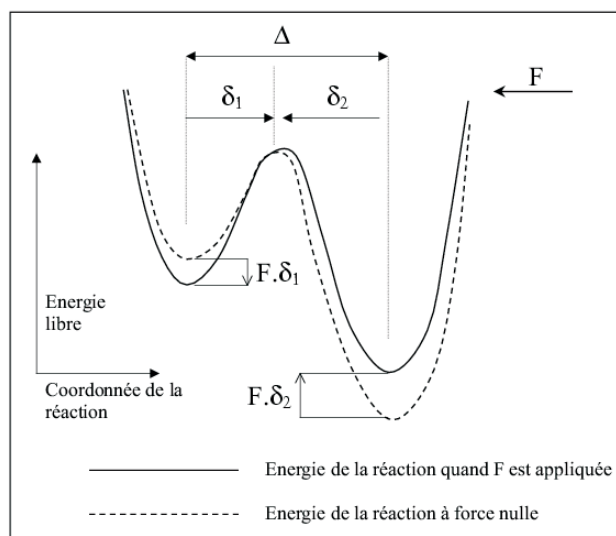


FIG. 5.30 – Déformation du profil d'énergie libre d'une réaction sous l'effet d'une force. Tant que la force appliquée reste faible, une valeur algébrique $\delta_i F$ est ajoutée à l'énergie libre au niveau des minima locaux ; δ_i est la distance du minimum local à la barrière d'activation et F la force appliquée. Dans l'exemple, $F < 0$, $\delta_1 > 0$ et $\delta_2 < 0$.

où $\delta_1 + \delta_2 = \Delta$ est le pas effectué. δ_1 et δ_2 sont des distances caractéristiques associées à la forme particulière du potentiel de la réaction considérée (voir figure 5.30). La constante de dissociation dans la réaction $A \rightleftharpoons B$ s'exprime alors par :

$$K_{diss}(F) = \frac{k_{off}(F)}{k_{on}(F)} = e^{\delta G/RT} \cdot e^{F\Delta/kT}$$

où δG est l'énergie libre de la réaction à force nulle et vérifie : $k_{off}(0)/k_{on}(0) = e^{\delta G/RT}$.

Dans le cas qui nous intéresse, on attend donc pour K_m une expression du type :

$$K_m(F) = \frac{k_{-1}(F)}{k_1(F)} = e^{\delta G/RT} \cdot e^{F\Delta/kT}$$

où Δ représente la distance effectuée lors de l'étape de fixation-avancée. Dans la partie 5.2, on a montré que si le K_m s'exprimait sous la forme d'une exponentielle $\exp(F\Delta/kT)$, la distance Δ était de l'ordre de 0.16 nm, soit une demi-base (cf. figure 5.19). On en déduit que dans le cas d'un couplage fort, les résultats sont compatibles avec un pas d'une demi-base durant la fixation du NTP. Ceci pose un problème car le pas effectué lors d'un cycle entier doit être d'une base (un NTP est incorporé par cycle). Il existe dans ce cas au moins une autre étape liée au mouvement d'une demi-base. Or, dans les expériences, la constante V_M (qui dépend de toutes les étapes qui suivent la fixation) n'est pas modifiée par la force : cela signifie que la seconde étape liée au mouvement doit être très rapide car elle n'est jamais limitante dans la gamme de force explorée (5-20 pN).

Dans le cas d'un couplage fort, les résultats indiquent donc que le mouvement lié à la fixation du NTP dans le site actif de la polymérase est d'une demi-base, et qu'il existe alors au moins une autre étape du cycle lié au mouvement, étape rapide qui n'est pas suffisamment ralentie par la force de charge dans la gamme explorée (<20 pN) .

Nous allons considérer par la suite des modèles impliquant un "couplage faible" entre fixation et avancée : dans cette approche qui me paraît plus réaliste, la première étape du cycle est décomposée en deux sous-étapes correspondant à la fixation et à l'avancée. Dans le premier cas traité, l'avancée précède la fixation (modèle 1 ou modèle de Guajardo et Sousa) ; dans le second (modèle 2 et 3), la fixation précède l'avancée. Comme dans le cas du couplage fort, nous allons dégager les conséquences des résultats expérimentaux, suivant le modèle de translocation considéré.

Le modèle de Guajardo et Sousa pour les polymérases (modèle 1)

Guajardo et Sousa ont proposé un modèle de translocation pour les polymérases faisant intervenir les fluctuations thermiques, et intégrant des arguments structuraux ainsi que des résultats obtenus sur différentes polymérases [74]. Dans ce modèle, on suppose que la polymérase ayant incorporé la $n^{ième}$ base peut occuper quatre positions sur l'ADN notées P1, P2, P3 et P4 par diffusion, avant la $n + 1^{ième}$ incorporation (cf figure 5.31). La position P2 est la plus stable : le site actif se trouve au niveau n sur l'ADN et est occupé par le dernier nucléotide incorporé par la polymérase. Dans la position P3, la polymérase a diffusé en aval et le site actif, qui se trouve au niveau $n + 1$ est libre : un nouveau NTP peut entrer pour la $n + 1^{ième}$ incorporation. Dans la position P4 la polymérase a effectué un pas de plus en aval, le site actif est à $n + 2$; la perte des contacts avec l'ADN et l'ARN rend cet état défavorable. Enfin la polymérase peut diffuser en amont et se trouver dans la position défavorable (voir ci-dessous) P1, le site actif étant occupé par la $n - 1^{ième}$ base incorporée.

On rappelle maintenant les hypothèses du modèle :

1. chaque position sur le substrat est associé à un minimum local d'énergie libre
2. la structure de la polymérase (notamment le pouce) assure le maintien du complexe : la dissociation est très lente devant le glissement possible de la polymérase sur le substrat, et n'est donc pas prise en compte
3. en l'absence de NTP lié au site actif la position P2 est favorisée par rapport aux autres positions car le nombre de contacts entre la polymérase et l'ADN ou l'ARN y est maximum.
4. la position P1 est considérée comme très défavorable par rapport aux positions P2 et P3, car elle oblige l'occupation par un double brin d'une région du site actif normalement occupée par du simple-brin.

Par simplicité, la modélisation de la liaison du NTP dans le site actif est réduite à deux étapes : en l'absence de NTP lié, la polymérase diffuse rapidement entre les positions P2 et P3 ; la liaison d'un NTP stabilise l'état P3, qui permet l'incorporation du nucléotide (cf. figure 5.31). A haute concentration en NTP, c'est l'état P3 qui est favorisé par rapport à l'état P1. Le schéma réactionnel suivant traduit ces considérations :

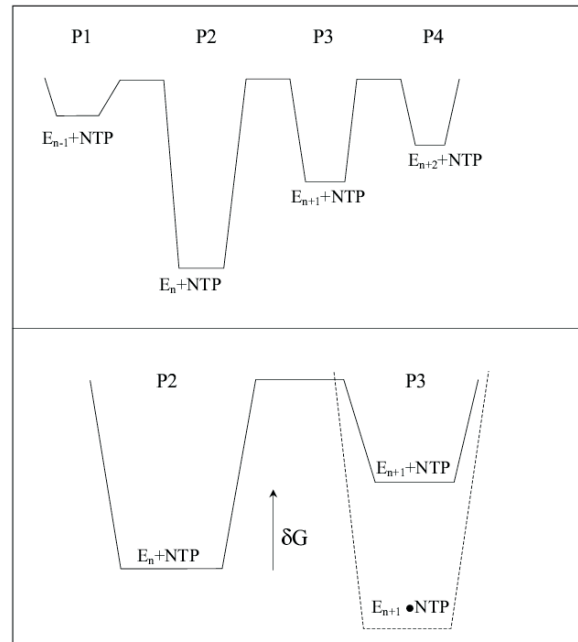
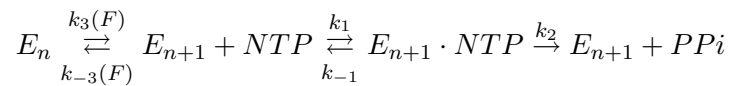


FIG. 5.31 – En haut : niveaux d'énergie libre suivant la position de la polymérase sur l'ADN, après la n^{ieme} incorporation. En bas : dans l'état P3, le NTP peut entrer dans le site actif, stabilisant le système polymérase + NTP. Le déplacement de la polymérase en aval, de P2 à P3, se fait par diffusion.



E_i désigne la polymérase à la i^{ieme} base sur l'ADN. La première étape correspond à la diffusion entre l'état P2 et l'état P3. Lors de la seconde étape, un nucléotide entre dans le site actif. La dernière étape correspond à l'hydrolyse et l'incorporation du NTP dans la chaîne d'ARN, et le retour de la polymérase à l'état P2. Le mouvement a lieu lors de la première étape et est indiqué par l'indice n ou $n + 1$.

A l'état stationnaire, et dans la mesure où $[PPi] \rightarrow 0$, la vitesse a une forme Michaelienne et on peut montrer qu'elle s'exprime sous la forme :

$$V = \frac{a[NTP]}{b + c[NTP]}$$

$$a = k_1 k_2 k_3$$

$$b = (k_2 + k_{-1})(k_3 + k_{-3})$$

$$c = k_1 k_3 + k_1 k_2$$

On définit alors :

$$\frac{1}{V_M} = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3}$$

$$\frac{K_m}{V_M} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1 k_2} \left[1 + \frac{k_{-3}}{k_3} \right]$$

Les étapes qui suivent la fixation du NTP (englobées dans k_2) étant supposées lentes par rapport à la dissociation du NTP, on a : $k_2 \ll k_{-1}$ et $k_2 \ll k_3$. La vitesse maximale et la constante de Michaelis se réduisent alors à :

$$\frac{1}{V_M} \simeq \frac{1}{k_2}$$

$$K_m \simeq K_D \left[1 + \frac{k_{-3}}{k_3} \right]$$

où $K_D = k_{-1}/k_1$ est par définition la constante de dissociation (entre le NTP et la polymérase). Le mouvement est supposé se produire lors de la diffusion de l'état P2 vers l'état P3, les constantes de réaction dépendant de la force sont donc k_3 et k_{-3} : k_3 diminue et k_{-3} augmente quand F croît. Dans ce cas, V_M est une constante, et K_m croît avec la force : *les résultats expérimentaux sont donc en accord avec ce modèle.*

Prenant une forme exponentielle de la dépendance des constantes à la force (cf. figure 5.30 et page 114), on écrit :

$$K_m(F) = K_D (1 + e^{\delta G/RT} \cdot e^{F\Delta/kT})$$

δG est indiqué sur la figure 5.31. Comme l'état P3 est moins favorable que l'état P2, δG est positif et donc : $e^{\delta G/RT} \geq 1$. D'après les résultats obtenus dans nos expériences, les trois valeurs de K_m déterminées à des forces de ≈ 5 , ≈ 11 et ≈ 15 pN donnent : $K_D \simeq 70 \mu M$, et $\delta G \rightarrow 0$ (cf. figure 5.32). On a imposé une valeur du pas $\Delta = 0.33$ nm correspondant à une paire de base. En effet, dans ce modèle, le mouvement correspond à une translation d'un nucléotide sur l'ADN. Les données indiqueraient donc que la diffusion d'une base en aval coûte peu d'énergie ($\delta G \rightarrow 0$), et que la variation d'énergie induite par la liaison du nucléotide serait d'une dizaine de kT ($\Delta G = kT \ln K_D$, avec $K_D \simeq 70 \mu M$).

Remarque : il est intéressant de noter que l'ajustement des données est meilleur si l'on autorise δG à être négatif (on obtient $K_D = 121 \pm 15 \mu M$ et $\delta G \sim -1$ kT, figure 5.32, courbe "Sousa modifié"). Dans ce cas, l'état P3 est *plus* favorable que l'état P2, d'un kT, et la variation d'énergie libre associée à la fixation du NTP dans le site actif est de ~ 9 kT. A partir d'une force de charge de ~ 12 pN, l'état P3 devient défavorable. Dans le modèle de Guajardo et Sousa, le déséquilibre entre P2 et P3 est expliqué par la perte de contact entre l'ARN et la polymérase quand cette dernière diffuse d'un nucléotide vers l'avant (laissant le site actif inoccupé). Si l'on suppose que P3 est plus favorable que P2, le gain d'énergie libre associé peut se justifier avec des arguments structuraux : certes un appariement disparaît dans l'état P3, mais chez plusieurs polymérases, les structures indiquent qu'un acide aminé interagit par empilement avec la dernière base incorporée (cf 2.4.1, *Les doigts*) ; cette interaction qui s'accompagne d'un changement de conformation peut rendre l'état P3 favorable par rapport à l'état P2.

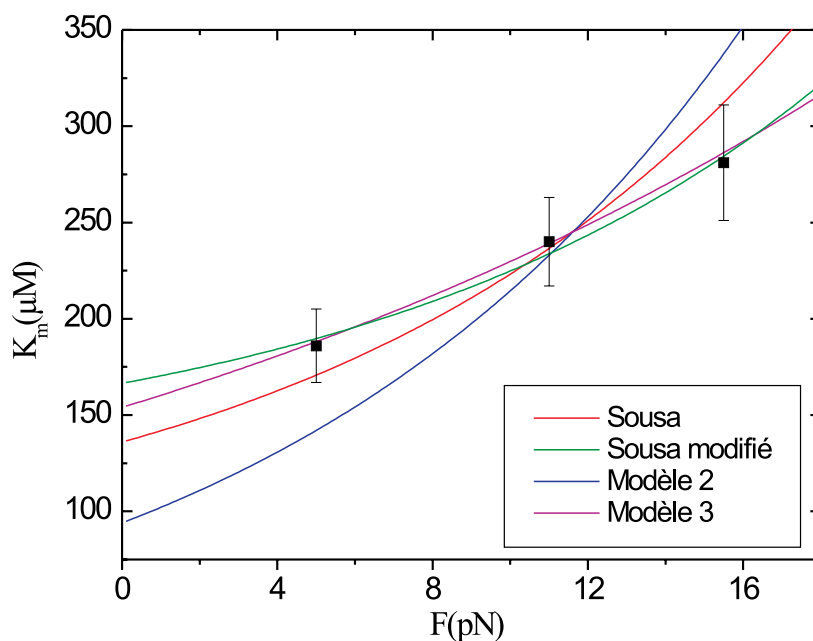


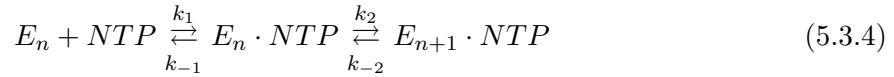
FIG. 5.32 – Ajustements de $K_m(F)$ dans les différents modèles considérés : **(a) Sousa** : modèle de Guajardo et Sousa ; les données sont ajustées par l'expression : $K_m(F) = K_D(1 + e^{\delta G/RT} \cdot e^{F\Delta/kT})$, avec les contraintes : $\Delta = 0.33$ nm et $\delta G > 0$ (sur la figure 5.31, l'état P2 est plus favorable que l'état P3) ; on trouve : $K_D \simeq 70$ μM et $\delta G \rightarrow 0$. **(b) Sousa modifié** : même modèle mais en autorisant δG à être négatif (sur la figure 5.31, l'état P3 est plus favorable que l'état P2) ; on trouve : $K_D \simeq 120$ μM et $\delta G \simeq -1$ kT. **(c) Modèle 2** : la fixation précède l'avancée, l'étape d'avancée est réversible ; les données sont ajustées par l'expression : $K_m(F) = \kappa e^{F\Delta/kT}$ (cf équation 5.3.8), avec la contrainte : $\Delta = 0.33$ nm ; on trouve : $\kappa \simeq 95$ μM . **(d) Modèle 3** : la fixation précède l'avancée, l'étape d'avancée est irréversible ; les données sont ajustées par l'expression : $K_m(F) = \chi e^{F\delta/kT}$ (cf. équation 5.3.9) ; on trouve : $\chi \simeq 155$ μM et $\delta \simeq 0.16$ nm. **(e) Couplage fort** : la fixation et l'avancée sont simultanées ; les données sont ajustées par l'équation : $K_m(F) = K_m(0)e^{FX/kT}$; en imposant $X = 0.33$ nm, on se ramène à l'expression obtenue dans le modèle 2. En laissant X variable, on se ramène à l'expression obtenue dans le modèle 3 ; dans ce cas, $X \simeq 0.16$ nm, et il existe donc au moins une autre étape très rapide liée au mouvement (cf. discussion dans le texte).

Autres alternatives

On imagine maintenant un modèle dans lequel le mouvement de la polymérase n'est pas dû à une simple diffusion de la protéine sur l'ADN. Comme on l'a souligné lors de l'analyse des résultats, le fait que V_M ne dépende pas de la force implique que l'avancée a lieu lors de l'étape de liaison du nucléotide dans le site actif :

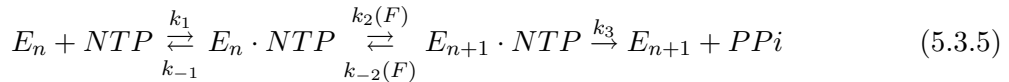


Suivant l'idée classique d'un changement de conformation induit par une interaction ligand-récepteur (ici la liaison d'un NTP dans un site catalytique), on fait l'hypothèse que la venue du NTP dans le site catalytique se décompose en deux étapes³³ :



La première étape correspond à une liaison faible entre le NTP et la polymérase et on suppose qu'elle n'induit pas de mouvement. Lors de cette liaison sans mouvement le long de l'ADN, le site catalytique n'est pas accessible : *cela suppose qu'il existe un autre site d'accueil pour le NTP en plus du site actif proprement dit*. Aussi, la discrimination n'est pas supposée avoir lieu lors de cette première liaison. De plus, la liaison étant supposée faible, la dissociation est rapide. La seconde étape décrit un changement de conformation plus lent que la liaison précédente, et accompagné du mouvement. Ce pourrait être la rotation des doigts observés lors du cycle d'incorporation des dNTP sur les ADN polymérases (cf. partie 2.4) : cette seconde étape ferait passer la polymérase de l'état "ouvert" à l'état "fermé".

Le cycle entier de la réaction peut s'écrire :



On peut montrer que ce schéma conduit à l'expression Michaelienne suivante de la vitesse :

$$V = \frac{a[NTP]}{b + c[NTP]}$$

$$a = k_1 k_2 k_3$$

$$b = k_2 k_3 + k_{-1}(k_{-2} + k_3)$$

$$c = k_1 k_2 + k_1(k_{-2} + k_3)$$

³³Cette décomposition est suggérée par Keller et Bustamante [93]. On note que les expressions 5.3.3 et 5.3.4 sont équivalentes si on pose :

$$k_{on} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}$$

$$k_{off} = \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_2}$$

On en déduit des relations avec V_M et K_m :

$$\begin{aligned} \frac{1}{V_M} &= \frac{1}{k_3} \left(1 + \frac{k_{-2}}{k_2}\right) + \frac{1}{k_2} \\ K_m &= \frac{k_2 k_3 + k_{-1}(k_{-2} + k_3)}{k_1(k_2 + k_{-2} + k_3)} \end{aligned} \quad (5.3.6)$$

La cas qui nous intéresse est bien entendu celui où k_2 et k_{-2} dépendent de la force. Pour que la description soit compatible avec nos résultats, il faut que V_M soit indépendant de la force. D'après l'équation 5.3.6, il y a deux conséquences : (i) k_{-2}/k_2 doit être petit devant 1, et (ii) k_2 doit être grand devant k_3 . La première hypothèse signifie que le changement de conformation lié au mouvement est bien plus favorable que l'étape inverse ; la seconde hypothèse ($k_3 \ll k_2$) signifie que la catalyse de la liaison phosphodiester est l'étape lente du cycle. On a alors : $V_M \simeq k_3$, qui ne dépend plus de la force. Comment se simplifie l'expression de K_m ? La dissociation importante lors de la première étape (liaison faible) se traduit par $k_{-1} \gg k_2$. On en déduit :

$$K_m \simeq \frac{k_{-1}}{k_1 \left(1 + \frac{k_2}{k_{-2} + k_3}\right)} \quad (5.3.7)$$

Deux cas de figure extrêmes se présentent alors : l'un dans lequel k_3 est négligeable devant k_{-2} , et l'autre dans lequel k_3 est grand devant k_{-2} . Ce dernier cas de figure est celui d'une seconde étape quasi-irréversible. Les deux cas aboutissent à deux modèles que l'on nomme modèle 2 et 3 (le modèle 1 correspondant à celui de Guajardo et Sousa).

Modèle 2 : considérons tout d'abord le premier cas : $k_3 \ll k_{-2}$. On a toujours $k_{-2} \ll k_2$, afin que V_M ne dépende pas de la force. On réduit alors l'expression de K_m :

$$K_m \simeq \frac{k_{-1}}{k_1} \frac{k_{-2}}{k_2}$$

Reprenant la notation $K_D = k_{-1}/k_1$, et la forme exponentielle de la dépendance des constantes à la force (cf figure 5.30 et page 114), on écrit :

$$K_m(F) \simeq K_D \frac{k_{-2}(0)}{k_2(0)} \exp\left(\frac{F\Delta}{kT}\right) \quad (5.3.8)$$

où Δ est le pas de l'enzyme. Dans le modèle proposé, le pas correspond à une base, soit 0.33 nm. Le résultat de l'ajustement aux données est présenté sur la figure 5.32 ; il est moins bon que celui obtenu avec le modèle Guajardo et Sousa.

Modèle 3 : considérons maintenant le second cas de figure correspondant à une deuxième étape quasi-irréversible dans le schéma 5.3.5 : $k_3 \gg k_{-2}$. Gardant l'hypothèse $k_2 \gg k_3$ (i.e. V_M indépendant de la force dans la gamme 0-15 pN, cf équation 5.3.6), le K_m s'écrit, à partir de l'équation 5.3.7 :

$$K_m \simeq \frac{k_{-1}}{k_1} \frac{k_3}{k_2}$$

Notant $k_2 = k_2(0) \exp(-\frac{F\delta}{kT})$, la dépendance de K_m à la force prend la forme :

$$K_m(F) \simeq K_D \frac{k_3}{k_2(0)} \exp\left(\frac{F\delta}{kT}\right) \quad (5.3.9)$$

Il est important de noter que dans ce cas de figure, δ est une distance plus petite que le pas de l'enzyme supposé être d'une base (cf. figure 5.30) : c'est la distance sur laquelle la force s'applique, plus précisément, la distance à la barrière de potentiel. C'est l'irréversibilité de la deuxième étape qui conduit cette différence par rapport aux deux modèles précédents. Le meilleur ajustement (cf. figure 5.32) est donné dans ce cas pour $\delta \simeq 0.16$ nm, *i.e.* une demi-pas environ.

Puisque k_2 diminue quand la force augmente et que le rapport k_{-2}/k_2 augmente avec la force, on peut se demander dans quelle gamme de force les approximations $k_{-2} \ll k_2$ et $k_2 \gg k_3$ sont-elles valables ? En effet, il existe théoriquement un domaine de force dans lequel ces approximations deviennent fausses. Dans ce domaine, l'expression de $K_m(F)$ n'est plus une simple exponentielle et a une limite finie dans les modèles 2 et 3 :

$$K_m(F) \simeq K_D \frac{1}{1 + \frac{k_2(F)}{k_{-2}(F) + k_3}}$$

$$\lim_{F \rightarrow \infty} K_m(F) = K_D$$

Cependant, dans la mesure où V_M ne dépend pas expérimentalement de la force dans la gamme 0-15 pN, les approximations sont justifiées (cf. équation 5.3.6), et on doit privilégier les expressions 5.3.8 et 5.3.9 pour le $K_m(F)$ déterminé expérimentalement.

Dans le modèle 1 de Guajardo et Sousa, $K_m(F)$ tend théoriquement vers l'infini quand $F \rightarrow \infty$. On pourrait ainsi distinguer les modèles expérimentalement en étudiant la dépendance de K_m à la force. Parallèlement à une saturation de K_m , on devrait observer dans les modèles 2 et 3 l'apparition d'une dépendance de V_M à la force. Il faudrait cependant appliquer des forces supérieures à 15-20 pN : ces expériences sont peut-être impossible à effectuer car la déformation voire le dépliage d'une partie de la protéine pourrait modifier la cinétique. Pire, les forces pour lesquelles les modèles diffèrent théoriquement pourrait être supérieures à la force d'arrêt expérimentale de la polymérase.

Discussion

Comme on l'a déjà précisé dans la partie 2.4.1, deux structures différentes d'un fragment de l'ADNP de *Thermus aquaticus* (KlenTaq) ont été observées : l'une correspondant à un état dit "ouvert", et l'autre à un état "fermé". Sur la figure 5.33, les deux structures ont été superposées en partie.

Dans l'état ouvert, la poche dans laquelle se produit la réaction d'hydrolyse est accessible mais la base à coder (+1) est très loin du site catalytique. De plus un acide aminé Tyrosine conservé (Tyr 639 pour l'ARNPT7 et Tyr 671 pour KlenTaq) est positionné dans la poche en interagissant par empilement avec la base (-1) du brin codant. Lors du passage de l'état ouvert à l'état fermé, une hélice des doigts se déplace, "enfermant" le nucléotide dans la poche ; la

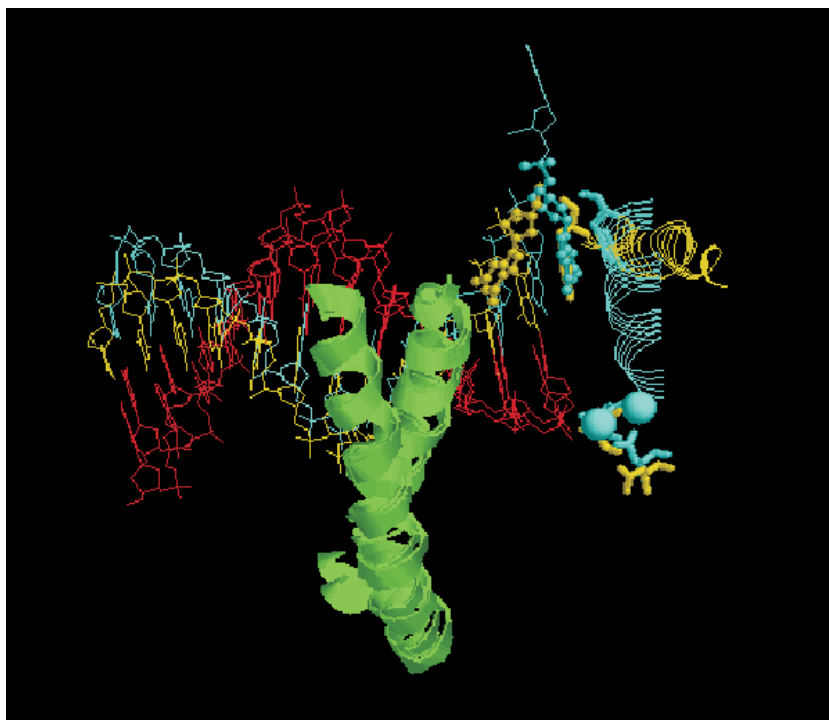


FIG. 5.33 – Superposition des structures "ouvertes" (code 2KTQ sur Protein Data Bank) et "fermée" (code 3KTQ) de l'ADNP de Taq. L'alignement est fait par rapport aux deux hélices α 527-551 et 453-478 appartenant aux "doigts", en vert sur la figure. Dans les deux structures, le brin synthétisé est en rouge. Les acides aminés Tyr 671, Asp 610 et Asp 785 sont en représentation "Stick", et la base G à codée est dans la représentation "Ball and Stick". Le brin codant et l'hélice O (660-670) sont en jaune dans l'état ouvert, et en bleu clair dans l'état fermé. Dans l'état fermé, les deux ions magnésium proches des acides aspartiques sont représentés par des boules bleu clair. Dans l'état ouvert, la base à coder n'est pas placée dans le site actif pour interagir avec le dNTP entrant. La Tyrosine 671 interagit par empilement avec la base du nucléotide précédemment incorporé. Dans l'état fermé, l'hélice s'est repliée vers le site catalytique qui n'est plus accessible, la Tyrosine s'est déplacée et a laissé place à la base codante. Dans ces deux structures, un nucléotide triphosphate est lié dans le site actif, mais n'est pas visible. On note qu'il n'est pas possible de superposer exactement les deux hélices d'ADN suggérant une légère différence de torsion entre les deux structures. La position des acides aspartiques est également légèrement différente entre les deux états.

Tyrosine s'est également déplacée laissant sa place à la base (+1) à coder : la catalyse peut avoir lieu.

Comme on l'a illustré en partie sur la figure 2.10, l'ARNPT7 présente des homologies avec Klen*Taq*, et l'hypothèse des états ouverts et fermés est facilement transposable à l'ARNPT7. Sur la figure 5.34 est schématisé un modèle d'avancée proposé pour l'ARNPT7, s'inspirant du modèle de Guajardo et Sousa et des structures cristallographiques de différentes polymérases présentant des homologies avec l'ARNPT7 (Klen*Taq*, la RT du VIH [7], l'ADNP de T7 [50]), et compatible avec les résultats de nos expériences de mesures de force.

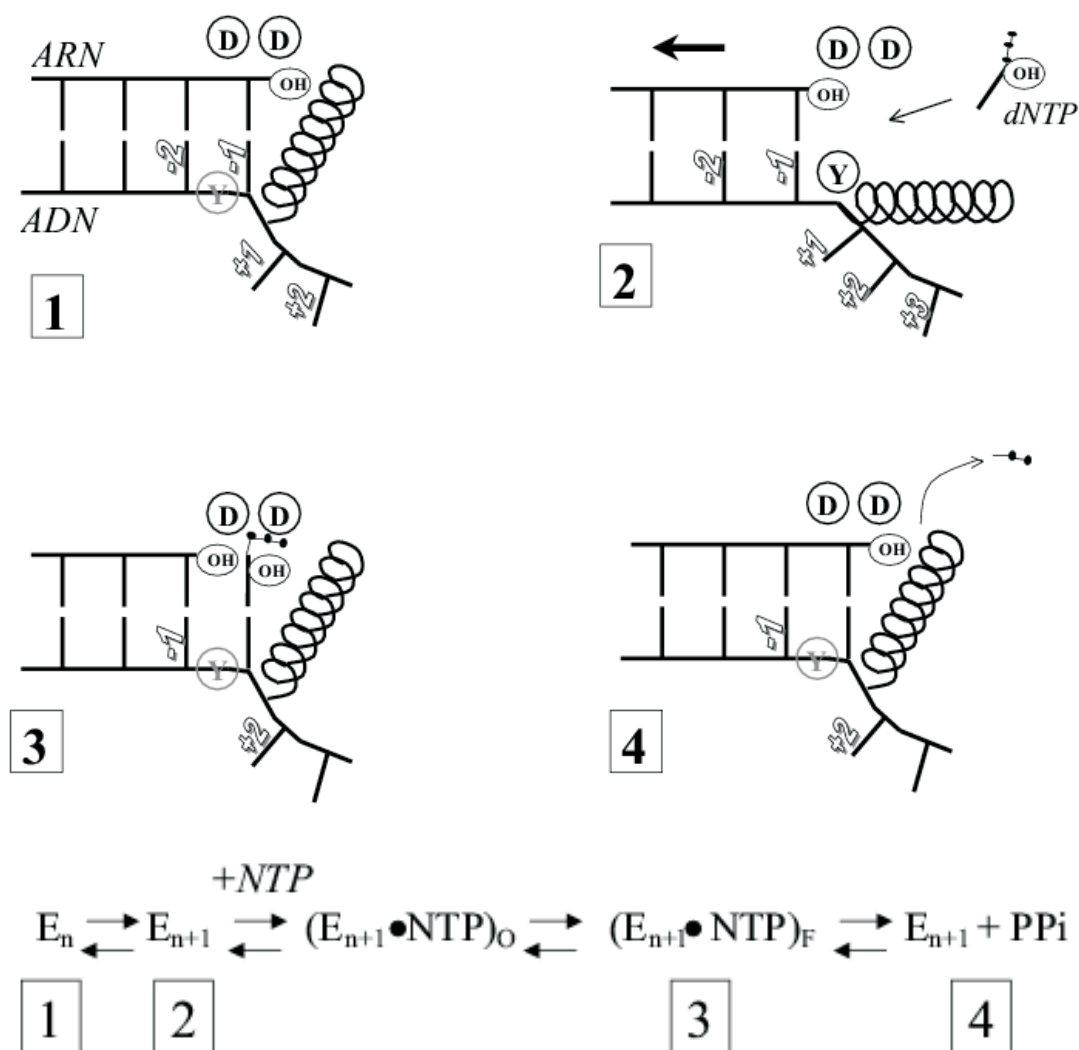


FIG. 5.34 – Modèle de translocation pour l'ARN polymérase de T7. Les deux D et le Y désignent respectivement les acides aminés Asp 537, Asp 812 et Tyr 639. L'hélice symbolise l'hélice Y et l'hélice Z de l'ARNPT7. -1- la polymérase vient d'incorporer la base notée (-1) et le site catalytique est occupé par cette base; la polymérase se trouve dans un état fermé, mais elle peut diffuser vers l'avant. -2- La polymérase s'est déplacée d'une base vers l'avant, l'hélice s'est ouverte dans le même temps et la Tyrosine 639 vient interagir par empilement avec la base codante (-1) : la polymérase est dans un état ouvert, et un nucléotide triphosphate peut entrer dans le site actif. La flèche indique le déplacement relatif de l'ADN par rapport à la polymérase. -3- L'entrée du nucléotide stabilise la position de la polymérase sur l'ADN : l'hélice se referme, la Tyrosine 639 s'écarte et laisse place à la base codante (+1) qui interagit par empilement avec la base codante (-1) et par appariement avec la base du nucléotide triphosphate qui vient d'entrer; la polymérase est dans un état fermé. Si le nucléotide n'est pas correct, l'état est instable et la polymérase repasse dans l'état ouvert précédent. Sinon, les acides aspartiques Asp 537 et Asp 812 participent à l'hydrolyse avec les deux ions magnésium (non représentés sur le schéma mais présents juste à côté des acides aspartiques). -4- Le nucléotide a été hydrolysé et le pyrophosphate peut être éjecté. La polymérase se retrouve dans un état fermé similaire à celui décrit en -1-.

5.4 Autres expériences sur des polymérases et moteurs moléculaires

Le groupe de J.Molloy étudie également la transcription de l'ARNPT7 à l'échelle de la molécule unique [70]. La configuration expérimentale utilise deux pièges optiques mobiles qui maintiennent deux billes auxquelles sont ancrées les deux extrémités d'un ADN à transcrire. Des polymérases sont attachées spécifiquement sur une bille collée à la surface de l'échantillon. L'ADN est "mis en contact" avec la billes recouverte de polymérases. La fixation d'une polymérase sur le promoteur est observée par le découplage des fluctuations de mouvement des billes dans leur piège respectif; la vitesse de transcription est déduite de l'extension de l'ADN (distance entre la polymérase et la bille en aval) et de la variation de force (mesurée par le déplacement de la bille dans le piège, en aval)³⁴.

Des transcriptions d'une durée allant jusqu'à 50 s ont été observées. La mesure de la dissociation du promoteur est en accord avec celle mesurée en volume. Dans la gamme 1-5 pN, la vitesse de transcription à 22°C est de l'ordre de 40 b/s, à 250 μ M chaque NTP, mesure en accord avec nos données³⁵.

Ci-dessous, on rappelle brièvement les résultats obtenus sur d'autres polymérases, puis sur d'autres types de moteurs moléculaires.

Trois polymérases ont été étudiées par des expériences de micromanipulation à l'échelle de la molécule : l'ARNP d'*E. coli* [66, 95, 65, 64, 68], l'ADNP de T7 [96, 69], et le fragment Klenow de l'ADNP d'*E. coli* [69]. Des configurations utilisées dans différentes expériences³⁶ sont illustrées sur la figure 5.35. Les deux études portant sur les ADNP ont été réalisées dans des conditions où l'application de la force n'a pas d'influence sur l'affinité des dNTP pour le site actif. Les données montrent que la vitesse est alors très dépendante de la force exercée sur l'ADN, indiquant que dans ces conditions l'étape limitante est directement affectée par la force. Le comportement de l'enzyme est lié à l'élasticité de la construction qui comporte une partie double brin (peu étirable) et une partie simple brin (particulièrement étirable) : en incorporant un dNTP, la longueur de simple brin diminue d'une base et celle de double brin augmente d'une base; suivant le niveau de force, l'enzyme fournit ou reçoit du travail, utilisé pour adapter la conformation du substrat.

Les expériences menées sur l'ARNP d'*E. coli* ont permis d'établir que dans la gamme 0-15 pN, à [NTP]= 1 mM chaque, la force n'avait pas d'influence sur la vitesse; autrement dit, l'étape limitante dans cette gamme de force n'est pas couplée au mouvement. Ce résultat est compatible avec ceux obtenus dans nos expériences sur l'ARNPT7. Ces expériences menées sur l'ARN polymérase d'*E. coli* ont cependant été limitées par : (i) la cinétique de transcription de cette enzyme qui est dominée par des pauses³⁷; (ii) la faible vitesse de transcription (≈ 20 b/s)

³⁴La méthode s'apparente au mode "extension constante" décrit au début du chapitre.

³⁵D'après les constantes de Michaelis déduites de nos données à 27°C, on attend une vitesse de ~ 80 b/s pour [NTP]=250 μ M chaque. En tenant compte d'un facteur ~ 1.7 (cf. "Effet de la température", page 107) entre les vitesses à 22°C et 27°C, la vitesse mesurée dans notre expérience devrait être ~ 47 b/s à 22°C.

³⁶Les expériences de Yin et al. [66] et Wang et al. [64] utilisent une configuration similaire à la notre, mais avec des polymérases adsorbées à la surface. Dans l'expérience d'Adelman et al. [68], l'ARNP et la surface sont fonctionnalisées pour permettre un attachement spécifique.

³⁷Au moins pour l'étude de Davenport. Le choix de la séquence codante est important : la récente expérience d'Adelman et al. [68] dans la même configuration que la notre montre que l'ARNP d'*E. coli* peut transcrire en

qui ne permet pas d'étudier facilement les variations de vitesses induites par des changements des conditions de transcription (concentration en NTP notamment) et demande un appareillage très sensible ; (iii) la complexité de la protéine (5 sous-unités) qui ne facilite pas son étude (problème de reconstitution des sous-unités).

Les récentes données d'Adelman et al. [68] semblent indiquer que la cinétique d'élongation de l'ARNP d'*E. coli* est homogène (dans la gamme 2-8 pN), les hétérogénéités provenant plutôt de variations statistiques dans la fréquence et la durée des pauses.

D'autres moteurs très étudiés dans la littérature sont la kinésine (100 kDa) et la myosine (500 kDa). Ces deux moteurs utilisent l'ATP comme source d'énergie³⁸. La kinésine transporte les organites (minuscules organes permettant à la cellule de fonctionner) en se déplaçant sur les microtubules (constituants du squelette cellulaire) ; la myosine se déplace sur des filaments d'actine et participe à la contractions des muscles. Il est apparu ces dernières années que ces deux moteurs partageaient des stratégies communes pour se déplacer [98, 97] : un changement de conformation similaire, lié à l'hydrolyse d'ATP. L'équipe de S.M. Block a étudié la processivité de la kinésine en fonction de la force de charge et de la concentration en ATP [100, 101]. Le comportement est Michaelien et il apparaît qu'à la fois le V_M et le K_m dépendent de la force. Les résultats sont cohérents avec l'hypothèse d'une avancée à la suite d'un changement de conformation induit par la liaison d'un ATP dans une des deux têtes de la kinésine [101]. Pour la myosine, le changement de conformation provoquant le mouvement est induit par la dissociation du Pi [102, 98].

Le F0F1 ATPase (350 kDa) est un moteur qui synthétise l'ATP au sein de la cellule et situé dans les mitochondries, les chloroplastes ou les membranes bactériennes. La source directe d'énergie de cette synthèse est un gradient de protons (ou d'ions sodium). Le moteur est constitué de plusieurs unités que l'on peut réunir en deux sous-ensembles : la partie F0 est dans une membrane et forme un canal transmembranaire ; la partie F1 est extrinsèque à la membrane. Les deux parties peuvent fonctionner indépendamment *in vitro*. Elles tournent autour d'une même axe et le sens de rotation est imposé par un gradient de proton pour F0 et par la synthèse ou la consommation d'ATP pour la partie F1. *In vivo*, les deux parties sont dépendantes l'une de l'autre : le sens de rotation de l'ensemble est imposé par le moteur "le plus fort". Ainsi, le gradient de protons (maintenu par un autre mécanisme) induit la rotation de la partie F0 : le sens imposé conduit alors à la synthèse d'ATP par la partie F1. Les rotations se font apparemment par pas de 120°, avec probablement deux sous-pas de 30° et 90° [105]. Ce moteur a été très étudié, notamment la partie F1, mais en mode "consommation d'ATP" uniquement. Les conclusions sur la *synthèse* d'ATP reposent sur l'hypothèse que le mécanisme de synthèse est le même que celui de l'hydrolyse. La partie F1 comporte trois sites qui accueillent à tour de rôle, à chaque rotation élémentaire : l'ATP, l'ADP et le Pi. Il reste une interrogation concernant l'occupation des trois sites [106], car certains auteurs pensent qu'à chaque rotation élémentaire l'un des sites

n'effectuant que des pauses transitoires distribuées aléatoirement en temps et en distance.

³⁸La kinésine et la myosine dégrade l'ATP en ADP par la réaction : $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{H}_3\text{PO}_4$; le produit dégradé (H_3PO_4) est noté Pi. La réaction dégage une énergie de ~ 30 kJ/mol.

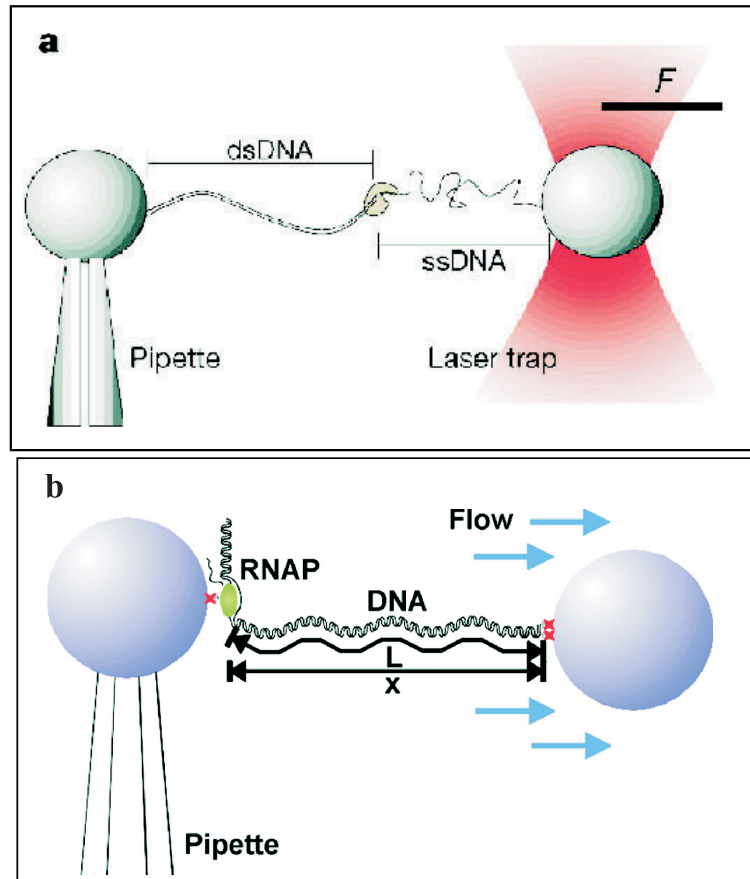


FIG. 5.35 – **(a)** Configuration expérimentale utilisées par Wuite et al. [96] : la bille de gauche est immobilisée par une micropipette, celle de droite est maintenue dans un piège optique appliquant et mesurant une contrainte mécanique à la construction d'ADN ancrée entre les deux billes. La construction contient une partie simple brin et une partie double brin. Quand une ADNP polymérise le brin complémentaire à la partie simple brin, la tension de l'ADN augmente car les propriétés élastiques du simple brin et du double brin sont très différentes [67]. Dans l'expérience, la force est maintenue constante en diminuant la distance entre les deux billes. Le nombre de bases incorporées est déduit de la force (mesurée par le changement de direction de la lumière émergeant du piège [67]), de la distance entre les deux billes (mesurée par analyse vidéo) et du nombre total de bases dans la construction. **(b)** Configuration expérimentale de Davenport et al. [95] : la polymérase est attachée spécifiquement sur la surface de la bille de gauche via une liaison biotine-streptavidine. Un écoulement constant dans l'échantillon exerce une force calibrée sur la bille de droite, celle de gauche étant maintenue par une micropipette. La transcription induit une réduction de la distance entre les deux billes, mesurée par analyse vidéo.

pourrait rester vide. Dans certaine expériences, la force a été introduite indirectement en fixant un filament d'actine sur la protéine et en faisant varier la viscosité du milieu [105].

Dans un modèle décrivant le fonctionnement de la partie F0, Dimroth et al. [89] font intervenir les fluctuations du bruit brownien comme un élément déterminant pour le mouvement du rotor, couplées à des interactions électrostatiques permettant de rectifier le sens de diffusion.

Les flagelles des bactéries (≈ 10000 kDa) font l'objet de nombreuses études également. Ces moteurs sont responsables du mouvement des bactéries : un rotor, actionné par le transport transmembranaire d'ions (H^+ ou Na^+), permet la rotation d'un filament externe hélicoïdal auquel il est relié. Comme pour la synthèse d'ATP, le rotor peut tourner dans les deux sens ; le contrôle de la direction est une des bases de la chimiotaxie³⁹. La vitesse de rotation de ce moteur présente une dépendance marquée à la force de charge [107].

Un moteur compactant l'ADN viral dans sa capsid (le moteur du bactériophage $\Phi 29$) a été étudié par Smith et al. [99]. C'est le moteur qui supporte la plus grande force de charge parmi les moteurs étudiés à ce jour (≈ 60 pN). Dans les conditions de l'expérience, avec une concentration en ATP saturante⁴⁰, l'étape limitante dépend de la force, même à basse tension mécanique, mais ne correspondrait pas au pas principal de translocation, déterminé par des expériences "en volume" [99]. Ce pas est de deux paires de bases (0.66nm) et correspond au mouvement observé par ATP consommé. Par l'analyse de la courbe représentant la vitesse en fonction de la force Smith et al. trouvent une distance caractéristique de ~ 0.1 nm.

Le tableau suivant rassemble quelques données caractéristiques des moteurs :

Moteur	V_m (nm/s)	R_m (rev/s)	Pas (nm)	Pas (deg)	F_{stop} (pN)	M_{stop} (pN·nm)
Kinésine	800		8		6	
Myosine	8000		15		4	
F1		100		120		40
F0		100		30		
Flagelles	45000	1700*		<1		4800
$\Phi 29$			0.66**		60	
E coli RNAP	2-8		0.33		25	>5
T7 ADNP	10-20		0.33		35	
T7 RNAP	80		0.33		>20	

V_m et R_m désignent respectivement la vitesse maximale (pour les moteurs linéaires) et la vitesse de rotation maximale (pour les moteurs rotatifs) ; M_{stop} est le moment équivalent à la force d'arrêt des moteurs linéaires.

(*) pour les moteurs à Na^+ ; pour les moteurs à protons, la rotation maximale est de 300

³⁹tendance pour la bactérie à se déplacer dans une direction déterminée sous l'influence de divers stimuli.

⁴⁰0.5 mM ATP, 5 μ M ADP et 5 μ M NaH_2PO_4 (source d'ion phosphate) ; l'ATP est à saturation car l'accroissement de sa concentration d'un facteur 10 ne modifie pas la vitesse de compactage.

(**) pas correspondant à deux paires de bases : mouvement par ATP consommé mesuré en "volume", différent de la distance caractéristique sur laquelle la force agit (≈ 0.1 nm, cf [99]).

Les données sont principalement tirées de [104]

On remarque qu'un moteur résiste à des forces plus importantes quand son pas est petit (comparer les polymérases, le $\Phi 29$ et les flagelles avec la kinésine et la myosine).

La sensibilité à la force des flagelles et du $\Phi 29$ indique que ces moteurs utilisent peut-être directement la source d'énergie (le flux d'ions pour les premiers, l'hydrolyse de l'ATP pour le second) pour se déplacer, adoptant un mode de "Power Stroke".

La kinésine, la myosine et le F1 ATPase se déplacent grâce à des changements de conformation induits par des liaisons et/ou des dissociations de l'ATP, de l'ADP et/ou du Pi : l'hydrolyse n'est pas utilisée comme source directe d'énergie.

Ce tour d'horizon rapide fait apparaître la diversité des comportements observés et les stratégies différentes adoptées par chaque moteur lors de l'évolution. On peut faire l'hypothèse que chaque système s'est adapté suivant les fonctions qu'il avait à remplir. Il semble ainsi que le mode de déplacement par diffusion soit favorable pour des moteurs à petit pas ; pour effectuer un pas long, la diffusion est peu efficace (car le travail à chaque cycle est proportionnel à la longueur du pas) et le changement de conformation induit par une liaison avec une particule comme l'ATP (ou ces éléments dégradés) devient un mode plus favorable.

En conclusion, notre étude sur l'ARNPT7 fait ressortir que ce moteur est un bon candidat pour une avancée par diffusion redressée. C'est actuellement le seul type de moteur qui ne montre pas de dépendance à la force de charge, au moins dans la gamme 0-15 pN. S'appuyant sur les homologies entre polymérases, il est raisonnable de proposer que ce mode de fonctionnement pourrait être celui adopté par les polymérases en général.

5.5 Quelques perspectives

L'étude de la transcription en élongation en présence de différentes concentrations en PPi devraient fournir des informations supplémentaires sur le mode d'avancée utilisé par l'enzyme.

Des études complémentaires devraient permettre d'apporter des éclaircissements sur l'effet non-Michaelien et son origine. Il sera notamment intéressant de poursuivre les expériences en utilisant des concentrations non homogènes en NTP, et aussi d'étudier l'influence de la présence d'analogues non incorporables. L'effet non-Michaelien observé sur l'ARNPT7 est opposé à celui observé sur l'ARNP d'*E. coli* [75], et il sera intéressant également de déterminer quel est le comportement d'autres polymérases.

L'effet de la température n'a pas été clairement caractérisé. Nous pensons cependant au vu des observations très préliminaires que nous avons obtenues que des expériences de transcription dans une gamme allant de 30°C à 37°C sont susceptibles de mettre en évidence des comportements différents de l'enzyme.

Enfin, la gamme de force utilisée est limitée notamment par les changements de conformations

subis par la polymérase sous l'effet de la contrainte mécanique. Pour élargir cette gamme de force, il est envisageable de mener le même type d'expériences en appliquant une force de traction plutôt qu'une force de charge : en adoptant une configuration où le piège tire l'ADN en amont et non en aval, on favorise la translocation de la polymérase (utilisation d'une "force négative"). Cela devrait permettre de compléter le réseau de droites dans la représentation $1/V$ en fonction de $1/[NTP]$, et d'étendre l'étude de la dépendance de K_m à la force.

Chapitre 6

Mesure de friction rotationnelle de l'ADN par ouverture mécanique de la double hélice

6.1 Configuration moléculaire pour l'ouverture de la double hélice de l'ADN

L'équipe de U. Bockelmann et F. Heslot a été la première à mesurer la force inter-brin en ouvrant mécaniquement une double hélice d'ADN [140]. Les expériences ont tout d'abord été menées en utilisant une micro-aiguille pour imposer et mesurer la force (la force est déduite de la déviation du levier mesurée par analyse vidéo). Ces études ont permis de montrer la dépendance du signal de force à la séquence et plus précisément à la teneur en paires AT et CG. La raideur de l'instrument de mesure intervient directement dans la résolution du signal de force mesurée, et l'utilisation d'un piège optique (raideur ~ 100 pN/ μ m) à la place du levier (~ 1 pN/ μ m) a permis d'améliorer cette résolution en la portant à une échelle d'une dizaine de paires de bases. Toutes les propriétés observées grâce à l'utilisation du piège optique ont été décrites dans une étude à part entière [119]. La construction utilisée pour mesurer la force nécessaire à l'ouverture mécanique de l'ADN est schématisée sur la figure 4.2 page 57. Les détails des étapes permettant d'aboutir à cette construction sont détaillées dans [119].

La configuration expérimentale est exposée sur la figure 6.1. L'objet est ici d'étudier la dynamique de l'ouverture et fermeture d'une molécule d'ADN. Dans la configuration utilisée, la molécule qui s'ouvre doit tourner simultanément, subissant une friction visqueuse que l'on se propose de caractériser.

6.2 Rotational drag on DNA : a single molecule experiment, Article paru dans Physical Review Letters, P. Thomen, U. Bockelmann, F. Heslot, Vol. 88, Issue 24 (248102)

Within a single molecule configuration, we have studied rotational drag on double stranded linear DNA by measuring the force during mechanical opening and closing

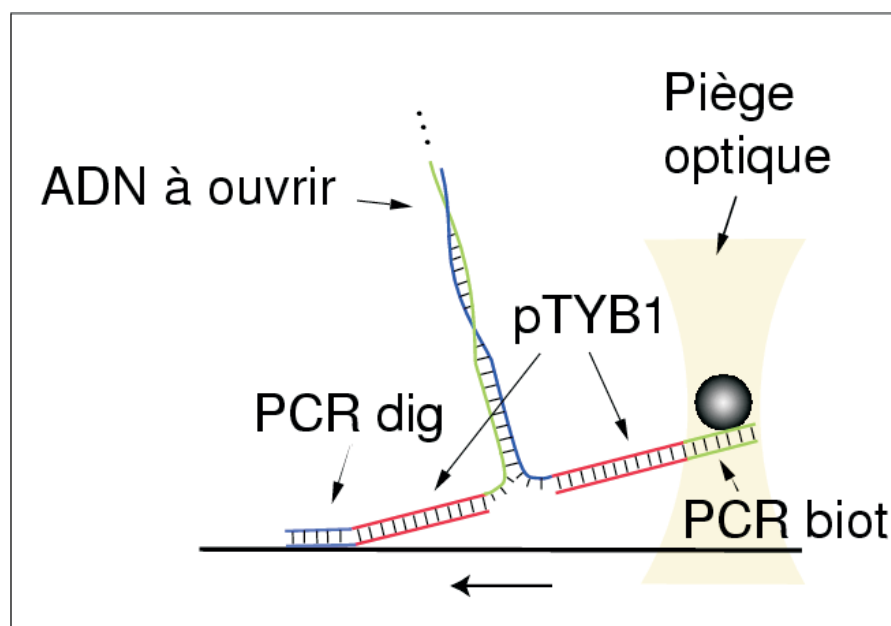


FIG. 6.1 – Configuration schématique de l'expérience d'ouverture mécanique de l'ADN. Le déplacement de la surface dans le sens indiqué éloigne les deux points d'ancrage de la construction, ce qui force l'ouverture de la double hélice.

the double helix at different rates. The molecule is cranked at one end by the effect of unzipping and is free to rotate at the other end. In this configuration the rotational friction torque τ on double stranded DNA leads to an additional contribution to the opening force. It is shown that the effect of rotational drag (i) increases with the length of the molecule, (ii) is approximately proportional with the angular velocity of cranking and (iii) we estimate that the torque τ is of the order of $1 k_B T$ for 10 kb DNA cranked at 2000 turns per second.

Torsional friction drag on DNA has been the subject of theoretical works but no direct experimental investigation. In a very early paper [137], Levinthal and Crane had examined DNA replication and analyzed the coupled DNA rotation. They proposed a simple estimate of the friction torque. Friction torque has also been invoked in the kinetics of in-vitro thermal DNA denaturation and renaturation [138] because DNA melting is expected to be coupled to a rotation of the double helix. Also, in the context of enzymes translocating on circular DNA, many in-vitro experiments have been modelled with the involvement of frictional torque of DNA as a way to allow a significant difference in the helicity of the DNA upstream and downstream of the enzyme (see ref. in [139]). P. Nelson has developed a model [139] to evaluate the frictional torque and has proposed that the torque may actually be orders of magnitude higher than estimated by Levinthal and Crane. The argument is that DNA does not rotate as a "speedometer cable" as assumed by earlier models. Instead the presence of natural bends in the DNA should induce

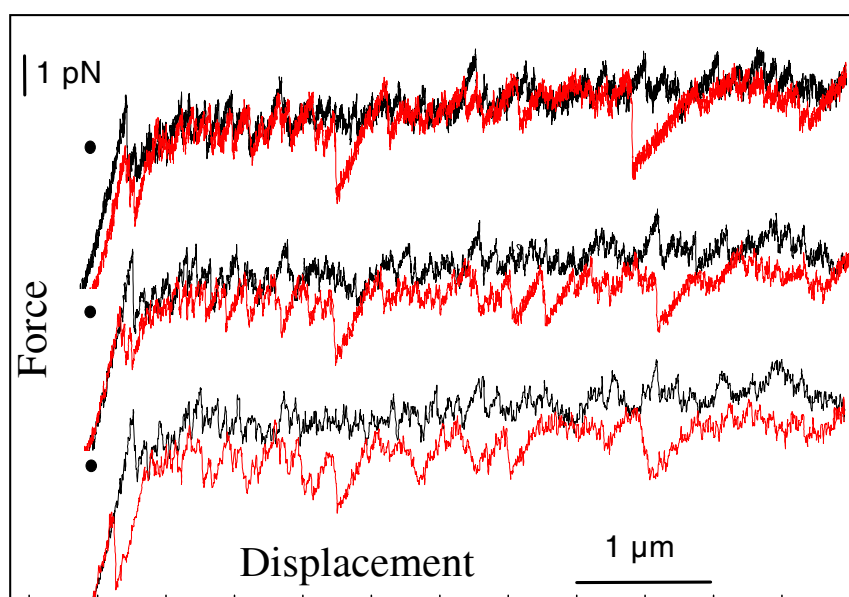


FIG. 6.2 – Three repeated openings (black curves) and closings (red curves) of the same molecule for three displacement velocities : $1 \mu\text{m/s}$ (top), $2 \mu\text{m/s}$ (middle) and $4 \mu\text{m/s}$ (bottom). The curves corresponding to different velocity have been shifted vertically for clarity. The dots indicate the same force level.

sideways motion of the molecule when rotating, an effect expected to be associated with a much higher friction. In this regard, an experimental determination of torsional friction of DNA is of interest and we report in this letter such measurement.

Unzipping of a DNA molecule is obtained by attaching the two single strands of one end of the molecule on two different solid supports that are progressively separated [140, 119] while the other end of the molecule is free to rotate. The experiment is performed under a microscope equipped with an optical trapping interferometer as a force measuring device [119]. Force measurement is performed in vitro on a molecular construction¹ anchored between a glass microscope slide and a silica bead ($0.5 \mu\text{m}$ radius) trapped in the optical trap. The opened molecule is λ DNA, comprising 48502 base pairs. After suitable calibration, the force is determined from the measurement of the bead position with sub-nm resolution. The bead is held in the trap while the sample is displaced laterally with a piezoelectric translation stage at a controlled velocity. This leads to the opening of the molecule.

We now briefly recall the main features of the force-displacement curve when unzipping occurs at low displacement velocities (below $1 \mu\text{m/s}$). Initially when the sample is displaced laterally, the force starts to rise to a sizeable value when the displacement becomes of the order of the length of the linker arms. The molecule begins to open at $\approx 14 \text{ pN}$: unzipping (or opening)

¹The molecular construction is described in [5]. On one extremity of λ DNA, the two single strands are connected to 7kb linker arms, each terminated by different types of ligands (digoxigenin and biotin). The molecular construction is anchored between a glass slide and a bead coated respectively with antibodies against digoxigenin and with streptavidin. The experiment is performed in PBS Buffer (10 mM phosphate, pH 7, 150mM NaCl).

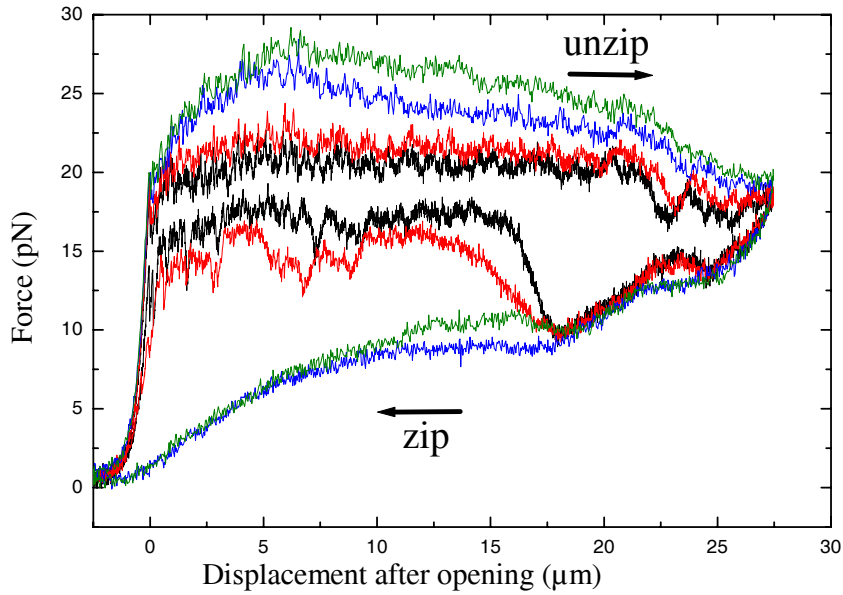


FIG. 6.3 – Force signal recorded upon opening and closing of the same molecule, at different displacement velocities ($4 \mu\text{m/s}$ (black), $8 \mu\text{m/s}$ (red), $16 \mu\text{m/s}$ (blue) and $20 \mu\text{m/s}$ (green)). The arrows indicate the direction of displacement.

then occurs with on the average about 1000 base pairs (1 kb) per μm of displacement. With 3 bases/nm for double-stranded DNA (ds-DNA), a stage displacement of d micrometers thus opens an average length $d/3$ micrometers of ds-DNA. A rotation of the double helix is associated with this DNA unzipping : the rate of rotation generated at the opening fork is related to the pitch of the double helix, *i.e.* approximately 1 turn for 10 bases opened, in the B form. At displacement velocity below typically $1 \mu\text{m/s}$, the unzipping force $F_{unzip}^0(d)$ *vs.* displacement d presents reproducible features that are governed by the sequence being opened [140, 119]. Those features are connected to the GC content along the molecule, and the typical amplitudes of the force variations are of the order of 10 % of the average force value. It is possible to zip (or close) an opened molecule by inverting the stage motion. Upon reopening a molecule after a cycle of opening and closing, the measurement is still similar to the initial measurement. In this low velocity regime, the measurements are also rather reproducible from one molecule to the other and the opening and closing signal does not depend significantly on velocity [119]. In fig. 6.2, we present an example of force measurements $F_{unzip}^v(d)$ and $F_{zip}^v(d)$ *vs.* displacement d , on a given molecule, and done with displacement velocities v varying between $1 \mu\text{m/s}$ and $4 \mu\text{m/s}$. When the velocity is increased in this range, more differences occur between $F_{unzip}^v(d)$ and $F_{zip}^v(d)$ at localized regions of displacement, *i.e.* those differences are sequence dependent [119].

In fig. 6.3 we present a measurement done on a given molecule where a number of openings and closings have been performed at different velocities from $v = 4 \mu\text{m/s}$ to $v = 20 \mu\text{m/s}$. Starting from an unopened molecule the stage is displaced with a velocity v . When the displacement has reached a given value (here $27 \mu\text{m}$ after opening) the motion is reversed (velocity $-v$); when the stage has reached the position it had before opening, this reverse motion is stopped for

a few seconds or more to allow for an eventual completion of reannealing. Another cycle of opening and closing is then engaged. We have checked that the order of velocities at which the experiments are performed is not relevant. The force measurements on a given molecule are quite reproducible (data not shown). The opening force $F_{unzip}^v(d)$ (closing force $F_{zip}^v(d)$) at velocity v occurs at a higher (lower) force, the higher the velocity. The signal presents thus hysteresis, an effect that increases with velocity. When stopping the displacement during opening, the force decreases toward the value expected for low velocity displacement. The relaxation times are of the order of 15 to 60 ms (data not shown). The zipping curves of fig. 6.3 display an approximately common large decrease in force as d is decreased from 27 μm to 18 μm , with very little local fluctuations. This effect is attributed to a slow reannealing of the central AT-rich region of λ DNA. When d decreases further, the force rises back for the 4 $\mu\text{m/s}$ and 8 $\mu\text{m/s}$ curves and the local fluctuations reappear, an indication that reannealing occurs approximately at the average speed imposed by the displacement. In this region there is however a different behavior for the zipping curve at higher velocity : the force vs. displacement curves decrease continuously to zero. We propose that this decrease corresponds to a regime where the velocity of reannealing of the molecule is less than the velocity imposed by the stage, *i.e.* the recombination of the molecule is not able to catch up with the displacement rate. Even if the motion is reversed before the AT-rich region has been opened, we observe the same kind of continuous decrease in the zipping curve for $v \geq 16 \mu\text{m/s}$ (data not shown). This shows that the continuous decrease in force observed for $d < 15 \mu\text{m}$ is not just a consequence of slow reannealing of the AT-rich region. We also observe that after at most one second, when the molecular construction is completely unloaded, it is possible to re-open the molecule with the same force level as before, indicating that reannealing has occurred.

An important characteristic of the type of measurement as presented for example in fig. 6.3, is the fact that the amplitude of the hysteresis cycle is strongly molecule-dependent as is discussed below. We write $F_{unzip}^v(d) = F_{unzip}^0(d) + \Delta F_{unzip}^v(d)$ (respectively $F_{zip}^v(d) = F_{zip}^0(d) + \Delta F_{zip}^v(d)$). Performing measurements on many different molecules, we find that when a small $\Delta F_{unzip}^v(d)$ is observed in the first few micrometers of the opening, the construct typically breaks after a rather small displacement. This strongly suggests the presence of a nick (break in only one of the strands of the double stranded DNA) : a nick will (i) lead to a breakage when the opening fork is close to it, and (ii) prevent the transmission of a significant mechanical torsion along the DNA [141]. When unzipping, the unopened part of the molecule is cranked positively at the opening fork and the rotational friction is responsible for an increase in the opening force while reversing the motion, rotational friction leads to a decrease in the measured force. The rotational friction is expected to be dependent on both the angular velocity ω of the cranking motion of the ds-DNA, and also on the effective rotating length L_{eff} of the molecule. The total length of the λ DNA molecule is 16.4 μm but the presence of randomly distributed nicks may give a shorter L_{eff} , unknown, and different from one molecule to another. Moreover, L_{eff} decreases during opening because the opening is coupled to a decrease in the length of the double stranded DNA. We note L_{eff}^{max} , the effective rotating length at the beginning of the opening.

We focus now on the role of the displacement velocity v . In fig. 6.4 plots of $\Delta F_{unzip}^v(d)$ and $\Delta F_{zip}^v(d)$ vs. velocity v are presented for three different molecules, where d (and therefore L_{eff})

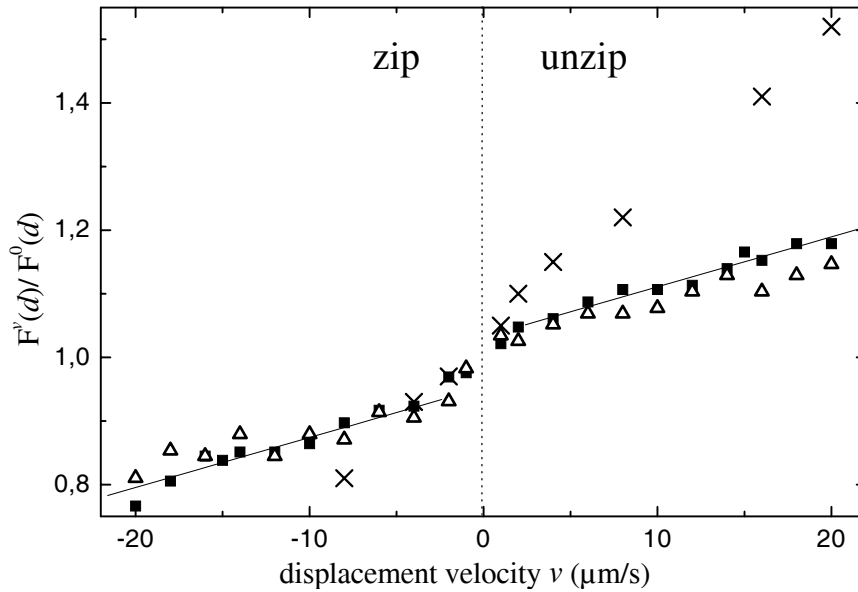


FIG. 6.4 – The normalized force $F^v(d)/F^0(d)$ as a function of displacement velocity v , for three molecules of different lengths. The positive (respectively negative) velocities correspond to unzipping (respectively zipping). Crosses are extracted from the experiment of fig. 6.3 : $d \simeq 8.4 \mu\text{m}$ and $L_{eff}^{max} > 9 \mu\text{m}$ because the opening without breaking was performed over this length ; (we estimate later that $L_{eff}^{max} \approx 12 \mu\text{m}$, see fig. 6.5) For negative velocities, the number of data points is limited because of reannealing delay occurring for high velocities (discussed in the text) ; squares : $L_{eff}^{max} \simeq 3.9 \mu\text{m}$ (rupture event) and $d \simeq 2.7 \mu\text{m}$; triangles : unknown effective length and $d \simeq 2.6 \mu\text{m}$. The lines are linear fits of the data corresponding to the squares, for $|v| > 4 \mu\text{m/s}$. The difference between the slopes for different molecules is attributed to different values of L_{eff} .

is fixed for each molecule. The dependence appears to be linear with v for opening and closing. The slopes of the curves vary from one molecule to the other and is inferred to be an effect of the length L_{eff} . ΔF vs. v presents a small but rapid variation at low velocity (around a few $\mu\text{m/s}$), taking the aspect of an offset. This offset around $v=0$ doesn't seem to depend on the effective length of the molecule ; thus it is not related to rotational friction. We rather interpret this effect as being related to the sequence dependent local hysteresis that was presented in fig. 6.2.

For a given molecule, L_{eff} decreases during the opening of the double helix and we expect to see the effect on the force level. In order to avoid confusion with variations in force occurring because of the effect of the sequence, we have chosen in fig. 6.5 to extract data of fig. 6.3 for a limited region $6 \mu\text{m} < d < 22 \mu\text{m}$ (corresponding to the opening between base pair index 6000 and 22000). In this region extending over $16 \mu\text{m}$ displacement, the sequence induced variations in the opening force are relatively small. As presented in fig. 6.5, the force is observed to decrease approximately linearly with displacement, an effect that we attribute to the progressively decreasing length of the molecule that has to rotate. We infer that in the initial stage of opening of the molecule (see fig. 6.3, for $d < 6 \mu\text{m}$) the progressive rise in force observed for $v \geq 16 \mu\text{m/s}$ may be attributed to a transient related to the beginning of the opening : it is possible that this

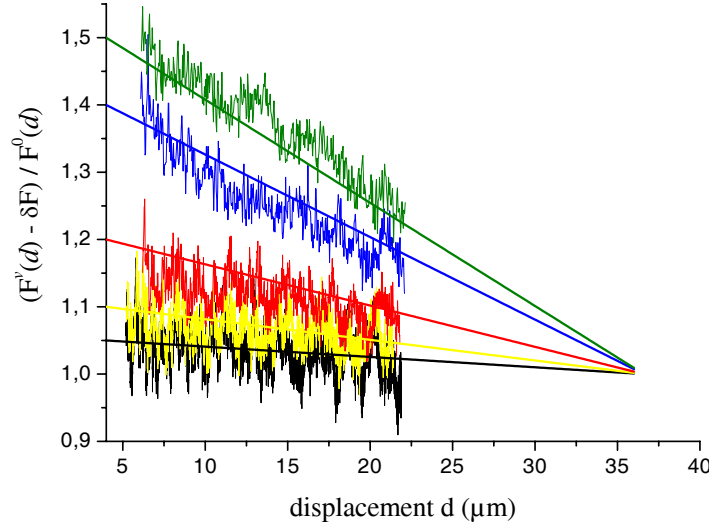


FIG. 6.5 – A part of a plot of $(F^v(d) - \delta F) / F^0(d)$ from fig. 6.3; δF is the offset near $v=0$ discussed above. This shows the effect of velocity and length. The corresponding velocities are : black : $2 \mu\text{m/s}$; yellow : $4 \mu\text{m/s}$; red : $8 \mu\text{m/s}$; blue : $16 \mu\text{m/s}$; green : $20 \mu\text{m/s}$. The linear fit curves are obtained using the simple expression : $(F^v(d) - \delta F) / F^0(d) = 1 + a \cdot v \cdot L_{eff} = 1 + a \cdot v \cdot (L_{eff}^{max} - d/3)$, with $L_{eff}^{max} = 12.2 \mu\text{m}$ and $a = 2.3 \cdot 10^{-3} \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-2}$.

is associated with a minimum time necessary for the propagation of the torsional stress down to the free end of the molecule.

Let us now discuss the various possible frictional effects and the torsional torque τ that the molecule undergoes in our experiments. During the process of unzipping DNA, one measures the force F which is applied to one of the two single strands of the DNA ; the same force is applied to the other single strand. Thus with respect to the opening fork and the local central axis of the molecule and if one assumes as a rough approximation that the bending stiffness of the single strands give a negligible effect, a torque $M = 2F.R$ is applied where R is approximately the crystallographic radius of double stranded DNA, taken to be 1nm . In this present unzipping configuration, the stage is moved laterally at a velocity v while the trap is fixed. Thus with respect to the laboratory coordinates (i) the liquid in the sample moves at a velocity v and (ii) the opening fork is predicted to be approximately in the middle of the two attachment points of the molecule and moves with a velocity $\frac{v}{2}$. Thus the unopened part of the molecule is pulled at the opening fork at a velocity $\frac{v}{2}$. It is then expected that the corresponding part of the DNA is both twisted as described before, and also partially stretched during the experiment. During the process of opening or closing DNA, the friction forces which may be relevant are : the rotational friction of the rotating double stranded DNA, the friction force f_{bead} applied directly to the bead because of a motion of the fluid, the translational friction force f_{transl} applied to the molecule to be opened because of a motion of the fluid. The force f_{bead} is estimated using the Stokes law :

with a bead radius $a = 0.5\mu\text{m}$ and a flow velocity $U = 10\mu\text{m/s}$, $f_{\text{bead}} = 0.1\text{ pN}^2$. For the DNA, we take a longitudinal friction coefficient of about 8.10^{-9} Ns/m as determined in [143] for an extended λ DNA. Taking a flow velocity $U = 10\mu\text{m/s}$, we get $f_{\parallel} \approx 0.08\text{ pN}$. Those translation friction drag effects are thus negligible as compared to the change in force presented in fig. 6.3. The measurements are dependent on the effective length of the molecule without nick. We can estimate the maximum observed torsional torque from fig. 6.3, for $d \simeq 6\mu\text{m}$, at $v = 20\mu\text{m/s}$; one gets $\Delta F_{\text{unzip}}^{20}(6) \simeq 9\text{ pN}$. This corresponds to $\tau_{\text{max}} = 2\Delta F_{\text{unzip}}^{20}(6) * R \simeq 5k_B T$. The naive model of a rigid rod following Levinthal and Crane [137] gives : $\tau = \mu_{\text{spin}} \omega L_{\text{eff}}$, where $\mu_{\text{spin}} = 4\pi\eta R_H^2$ [144], η is the viscosity of water and R_H the hydrodynamic radius of DNA taken to be 1.05 nm as estimated in [142]. For $\omega \simeq 12000\text{ rad/s}$ (corresponding to a displacement velocity of $20\mu\text{m/s}$), and $L_{\text{eff}} = 12\mu\text{m}$ (the estimated value of $L_{\text{eff}}^{\text{max}}$, given by the fit of fig. 6.5), the equation gives : $\tau \simeq 0.4k_B T$.

For reannealing to occur at the same average speed as the displacement velocity, the friction torque τ should be below the sequence dependent denaturation torque τ_0 , otherwise a denaturation bubble would form. This suggests that the denaturation torque sets an upper limit to the rate of reannealing for a given L_{eff} . In fig. 6.3, this rate limit is reached for $8\mu\text{m/s} < v < 16\mu\text{m/s}$; the corresponding $\Delta F_{\text{zip}}^v(d)$ near $d = 12\mu\text{m}$ give an estimate of the denaturation torque : $2k_B T \lesssim \tau_0 \lesssim 5k_B T$. Strick *et al.* [145] have made a single molecule measurement of τ_0 (for an AT-rich region of λ DNA, $\tau_0 \simeq 1.3k_B T$ in unsalted phosphate buffer). The denaturation torque analysis thus gives a reasonable order of magnitude.

P. Nelson has reported theoretical torque estimations for a naturally bent semiflexible rod [139]. In this case, the value of the viscous drag torque is then much larger as compared to the Levinthal-Crane estimation and our measurements; the equation 3 of ref. [139] gives : $\tau \approx 15000k_B T$ for $\omega = 12000\text{ rad/s}$, and $L_{\text{eff}} = 12\mu\text{m}$. The results of our experiments are therefore closer to the naive model of a rigid rod. In our experiment, a flow $U = v/2$ changes the configuration of the molecule. However, it has been reported both experimentally [146] and through modelling [147] that a tethered DNA in a uniform flow is not free-draining, up to a ratio r between extension and length of the molecule of 0.8 . Adapting those results for our configuration with λ DNA we get $r \simeq 0.4$ for $U = v/2 = 10\mu\text{m/s}$. From this, one expects that since hydrodynamic coupling is such that non-free-draining conditions occur for translation, there should be no extreme effects of the flow on rotational friction. Nevertheless unzipping experiments with a double trap would be of interest to evaluate by comparison the possible influence discussed above. Our present results indicate that the rotational drag undergone by DNA in our configuration is about $1k_B T$ per 10 kb DNA at 2000 turns per second, *i.e.* about 10 times the value expected for a straight rigid rod.

This work has been funded by CNRS and universités Paris VI and Paris VII.

²The distance between the bead and the surface of the sample is typically 2 to $4\mu\text{m}$. The influence of the solid surface is small and we take a viscosity : $\eta \simeq 10^{-3}\text{ pN.s.}\mu\text{m}^{-2}$.

Chapitre 7

Mesure d'une interaction ADN-protéine par ouverture mécanique de l'ADN

7.1 Introduction

On propose dans ce chapitre une méthode originale d'étude des interactions entre protéines et ADN, par des expériences sur molécule unique. Le travail présenté ici est similaire à celui publié tout récemment par Koch et al. [120] en utilisant d'autres protéines, mais le traitement des données y est différent.

Les expériences ont été effectuées en partie avec Lucile Loiseau. Dans ce chapitre, on utilise kT comme unité d'énergie que l'on pose égale à 4 pN.nm

7.1.1 Les endonucléases de type II

Les endonucléases de type II représentent une classe importante des protéines se liant à l'ADN et sont donc très étudiées. Elles protègent notamment les organismes procaryotes contre les infections en clivant l'ADN exogène. Elles sont capables de reconnaître des séquences de 4 à 8 bases avec une grande spécificité, ce qui font d'elles un modèle pour l'étude des interactions entre protéines et ADN. Toutes les endonucléases de type II sont des protéines homodimériques, et sont structurellement très proches les unes des autres. Le magnésium joue le rôle de cofacteur dans la réaction de clivage, et contrairement aux endonucléases de type I, celles de types II ne consomment pas d'ATP. Pour une revue complète sur les endonucléases de type II, on peut lire la revue de Jeltsch et Pingoud [129]. Une question importante est de connaître quel mécanisme l'enzyme utilise pour trouver son site spécifique sur l'ADN : longtemps il a été proposé qu'un grand nombre d'endonucléases de type II se déplaçaient sur l'ADN par diffusion linéaire (glissement ou "sliding") [121, 126, 128], mais des travaux récents montrent que des cycles (corrélés ou non) d'association/dissociation de site à site sur la même molécule (phénomènes appelés "hopping" et "jumping") seraient un mode de transfert probable [124, 125]; les avis sont donc partagés sur cette question. Dans les deux cas, la protéine trouve l'ADN par diffusion dans l'espace tridimensionnel (processus lent) et recherche ensuite sa séquence spécifique (processus rapide).

L'autre pan d'étude travaux concernant ces protéines se rapporte à la façon dont l'enzyme se lie sur sa séquence cible et interagit avec elle, par des études cristallographiques ou par observation indirecte de la liaison ou du clivage.

7.1.2 L'enzyme *EcoR* V

Parmi les endonucléases de type II, *EcoR* V est l'une des plus étudiées. Cette enzyme a pour séquence de reconnaissance spécifique : GATATC, et coupe celle-ci en son milieu (entre T et A) : chaque sous-unité de la protéine coupe un brin de l'ADN. Les structures cristallographiques montrent que la protéine établit également des contacts sur 3 ou 4 bases de chaque côté du site cible [130, 122]. Il a aussi été montré que les séquences adjacentes pouvaient modifier sensiblement les constantes d'associations entre l'enzyme et l'ADN (références 17 et 18 de [122]), observation faite également sur d'autres endonucléases de type II [131]. Les structures de la protéine avec différentes séquences d'ADN (spécifiques ou non) montrent qu'une courbure de l'ADN est nécessaire pour la reconnaissance du site [122, 123].

Nous avons imaginé une expérience originale sur molécule unique dans le but d'étudier la fixation d'*EcoR* V sur l'ADN. Dans l'expérience proposée, on peut estimer l'énergie de dissociation en mesurant de la force nécessaire pour "éjecter" l'enzyme par ouverture de l'ADN. Il est aussi possible de repérer les séquences sur lesquelles les protéines sont liées. Afin de retarder le clivage de l'ADN lors de l'expérience, du Ca^{2+} est utilisé à la place du Mg^{2+} . En effet, le calcium est connu pour permettre une liaison spécifique sur le site cible (K_m de 0.2 mM en présence de 5 nM Ca^{2+}) en atténuant le clivage (au moins d'un facteur 10^5 [127]). L'intérêt d'une telle expérience est de mesurer directement l'interaction entre la protéine et l'ADN.

7.1.3 Configuration

La configuration expérimentale est la même que celle exposée dans la partie précédente en utilisant la même construction moléculaire, *i.e.* une construction permettant d'ouvrir une molécule d'ADN. Dans l'expérience présentée ici, on introduit les enzymes *EcoR* V avant de procéder à l'ouverture d'une molécule d'ADN. Lors de cette ouverture, une protéine fixée sur l'ADN va éventuellement être capable d'empêcher transitoirement la poursuite de l'ouverture. Dans ce cas (puisque le déplacement de la surface est imposé) la force augmente jusqu'à ce que la protéine se détache (cf. figure 7.1). La séquence GATATC n'est pas présente dans les bras espaceurs de la construction, mais seulement dans l'ADN à ouvrir (voir tableau 1).

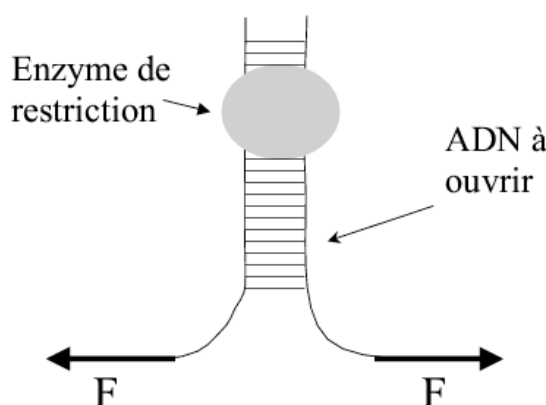


FIG. 7.1 – Schéma pour la détection d'une protéine liée à l'ADN par ouverture mécanique de la double hélice. Quand la fourche d'ouverture arrive au niveau de l'enzyme, cette dernière bloque momentanément le processus d'ouverture et la force augmente, jusqu'à l'éjection de la protéine.

#site	index	séquence
1	640	aaacgggatatcatcaaa
2	2080	aatgtcgatatcccgtat
	2903*	ggttatca
	4661*	agttatca
	6318*	ggttatcc
3	6640	accgacgatatcgaagcc
4	8080	atccgcgatatcgcagtc
5	8800	atgagcgatatcccgga

Tableau 1 : index de bases des sites spécifiques (GATATC) notée de 1 à 5, et des sites (GTTATC) présentant une affinité réduite (signalés par le symbole *), dans la séquence de l'ADN λ ouverte dans l'expérience. Les sites spécifiques sont notés de 1 à 5.

Le lot d'enzymes utilisé provient de Pharmacia et sa concentration est inconnue. Le tampon de dilution (TPd) contient 10 mM Tris (pH 8), 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT et 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BSA ; le tampon de l'expérience (TPe) contient 50 mM Tris (pH 8), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA et 5 mM CaCl_2 .

En pratique, on dépose tout d'abord les billes et l'ADN, mélangés dans le TPe (150 μl au total) sur la surface. Quand on trouve une molécule d'ADN accrochée entre une bille et la surface, on ajoute *EcoR* V (0.2 μl de protéines diluée dix fois dans du TPd + 20 μl de TPe). Plusieurs ouvertures et fermetures sont pratiquées tout en enregistrant le signal de force. Si l'ADN est coupé par l'enzyme, il est possible de rechercher une autre molécule et de recommencer la même expérience.

La présence de "nicks" sur la molécule, au niveau de la fourche d'ouverture entraîne une cassure irréversible de la construction (cf. partie précédente). La présence aléatoire de "nicks" restreint donc la gamme de séquence que l'on peut explorer ; c'est la raison pour laquelle l'étude

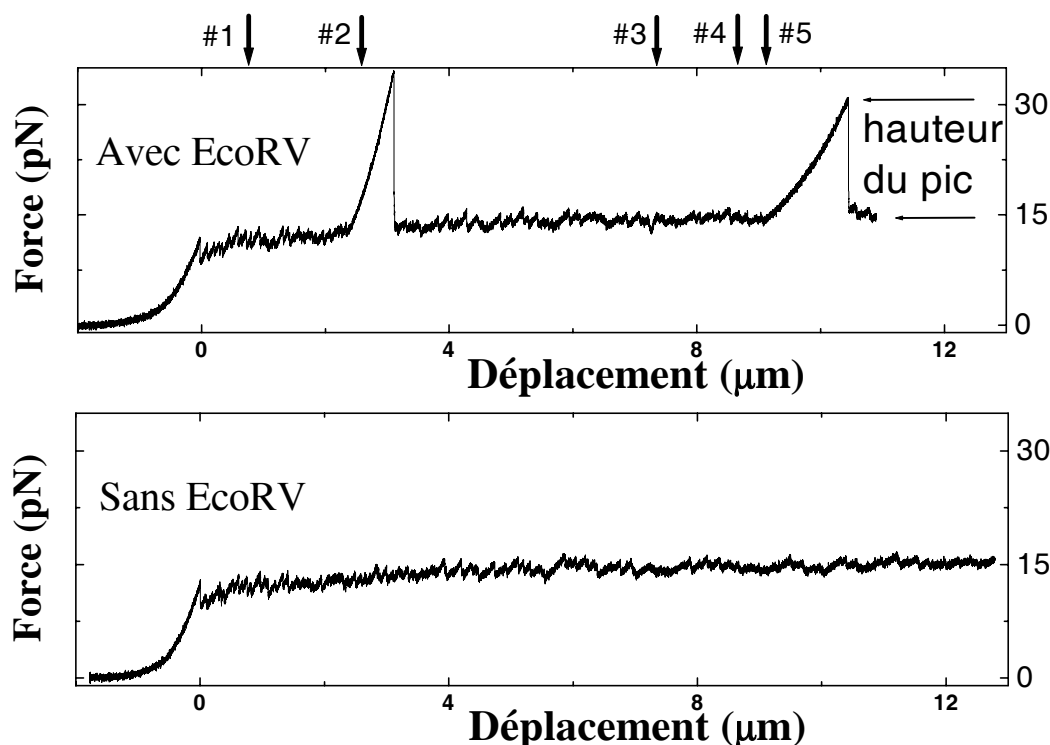


FIG. 7.2 – Signal d'ouverture en présence (courbe du haut) ou en l'absence (courbe du bas) d'enzyme; les numéros (#i) indiquent la positions des cinq sites spécifiques. Sur l'expérience présentée, des enzymes occupaient les sites #2 et #5.

se limite ici aux cinq premiers sites sur la séquence de l'ADN λ .

7.2 Résultats

7.2.1 Signal typique de force

Quand la molécule d'ADN est ouverte en l'absence d'enzyme, le signal de force correspond à des dents de scies autour d'une valeur moyenne de 15 pN [140]. En présence d'*EcoR V*, des pics se superposent à ce signal, d'une valeur très variable : 15 ± 10 pN, à des endroits localisés sur la séquence (figure 7.2). Lors de la fermeture, aucun signal significatif est observé, mais la réouverture immédiate peut faire apparaître de nouveaux des pics.

7.2.2 Les séquences spécifiques

Dans les travaux précédents concernant l'ouverture de la double hélice, un modèle théorique a été développé par Bockelmann pour décrire le signal de force séquence-dépendant en fonction du déplacement imposé [140]. Il est utilisé ici pour repérer les séquences sur lesquelles les pics sont observés : en superposant le signal expérimental et le signal théorique on peut, à 10-15 bases près connaître cette séquence. Ainsi, on peut vérifier que les pics observés sont toujours localisés

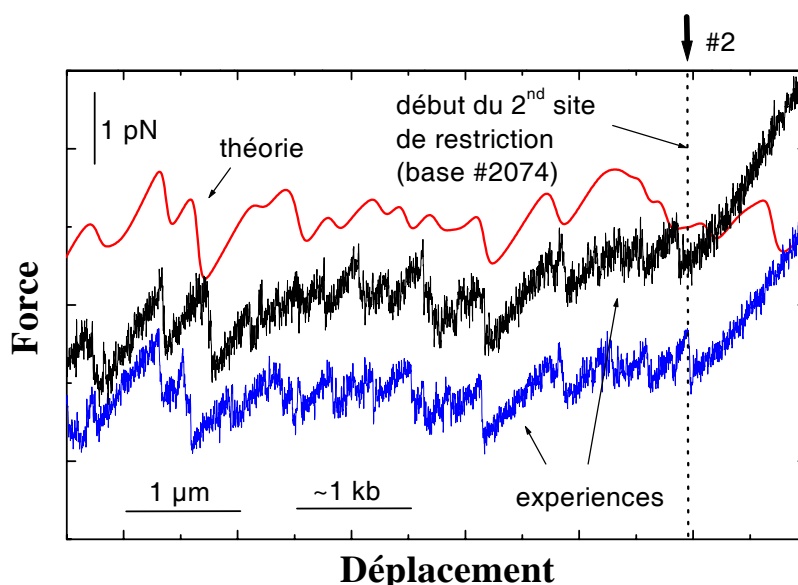


FIG. 7.3 – Localisation de la séquence sur laquelle l'enzyme s'est fixée. On a superposé le signal théorique et deux signaux expérimentaux en fonction du déplacement imposé; les courbes sont décalées en ordonnées pour la clarté.

proche de la séquence cible GATATC et jamais ailleurs (mis à part un pic, voir ci-dessous) : on suppose donc que les pics correspondent à une protéine ancrée sur son site cible¹. Un exemple de cette analyse est exposée sur la figure 7.3.

Il a été montré qu'*EcoR* V pouvait se lier sur une séquence non spécifique : GTTATC, avec une affinité très réduite [122]. Cette séquence est présente dans l'ADN λ , notamment trois fois dans la région étudiée (cf. tableau 1). Un pic (sur 32 observés au total) a été détecté sur le second site "étoile" de la construction, avec une amplitude réduite.

Le fait que l'on n'observe pas de pics lié à la fixation de l'enzyme sur les séquences non spécifiques indique que : (i) l'enzyme ne réside pas assez longtemps sur le site pour pouvoir être détectée, et/ou (ii) la force induite pour le détachement n'est pas détectable dans la configuration de l'expérience (typiquement, les variations de force < 1 pN sont difficilement détectables, car elles correspondent à la variation du signal en dent de scie en l'absence d'enzyme [140]).

Dans cette expérience, les sites explorés lors de l'ouverture ne sont pas tous occupés, signifiant que la concentration d'enzymes n'est pas saturante. Cela permet d'étudier la statistique d'occupation des sites (tableau 2). On remarque une inhomogénéité dans le pourcentage d'occupation qui va de ~ 50 % pour le site #4 à ~ 100 % pour le site #5.

¹Si la protéine n'était pas sur le site spécifique, on observerait des pics aléatoirement sur n'importe quelle séquence.

Sites :	#1	#2	#3	#4	#5	total
Exploration	15	14	11	6	6	52
Occupation (%)	10(67)	10(71)	6(55)	3(50)	6(100)	35 (67)

Tableau 2 : occupation statistique des sites. Le nombre d'explorations correspond au nombre de fois où la séquence du site a été ouverte ; le nombre d'occupations correspond au nombre de fois où un pic a été observé sur le site additionné au nombre de fois où la construction s'est "cassée" au niveau de la séquence cible (quatre fois en tout) ; entre parenthèse est indiqué le pourcentage d'occupation par rapport au nombre d'explorations.

7.2.3 La hauteur des pics

Informations sur l'affinité de chaque site

La valeur d'un pic est la force nécessaire pour éjecter l'enzyme, et s'ajoute à la force d'ouverture (cf. figure 7.2). Cette force supplémentaire pour éjecter l'enzyme est notée F_r par la suite. La valeur moyenne de F_r est de l'ordre de 15 pN (*i.e.* l'ordre de grandeur de la force nécessaire pour ouvrir la double hélice), mais une large variabilité est observée : les valeurs sont comprises (sur les sites spécifiques uniquement) entre 5 et 25 pN (31 pics, figure 7.4). L'amplitude de l'unique pic observé sur un site non-spécifique (le second site "étoile") est de 3 pN. Dans leur article, Koch et al. ne discutent pas les variations de hauteur des pics, mais on distingue bien sur les données qu'ils présentent (figure 2.A de [120]) une variabilité comparable à la notre : $\sim 5 < F_r < \sim 35$ pN. Evans et Ritchie [133] ont modélisé la dynamique de rupture d'une liaison chimique entre deux objets sous contrainte mécanique. Ils proposent que la force de rupture augmente avec la vitesse de charge (force par unité de temps), et que la dispersion de la force est gaussienne pour des vitesses de charges suffisamment grandes. Merkel et al. [134] ont vérifié la validité des prédictions sur l'étude d'une liaison récepteur-ligand par Microscopie par Force Atomique. La dispersion observée dans nos expériences pourrait donc être attribuée à un effet purement statistique.

Cependant, dans nos données, la dispersion de la force de rupture s'observe pour un site donné, mais également de site à site : par exemple, les valeurs de F_r/F_{ouv} valent respectivement 0.8 et 1.7 pour les sites #4 et #5. Il est intéressant de comparer ces variabilités de sites à sites aux variations du taux d'occupation de chaque site. Pour un site donné, on trouve en effet une corrélation entre le niveau moyen des pics de force et la fréquence d'occupation du site. Ceci est illustré sur la figure 7.5. Cette corrélation indique qu'il pourrait exister une différence d'affinité entre les cinq sites étudiés. Cette hypothèse reste à confirmer.

Informations sur la constante de dissociation

Un des intérêts de ce type d'expériences est de comparer la constante de dissociation K_D (entre l'ADN et la protéine) que l'obtient, avec celles mesurées par d'autres méthodes. Cette constante est reliée à l'énergie libre de liaison ΔG des deux molécules : $\Delta G = RT \ln K_D$.

K_D peut se calculer dans notre cas en effectuant :

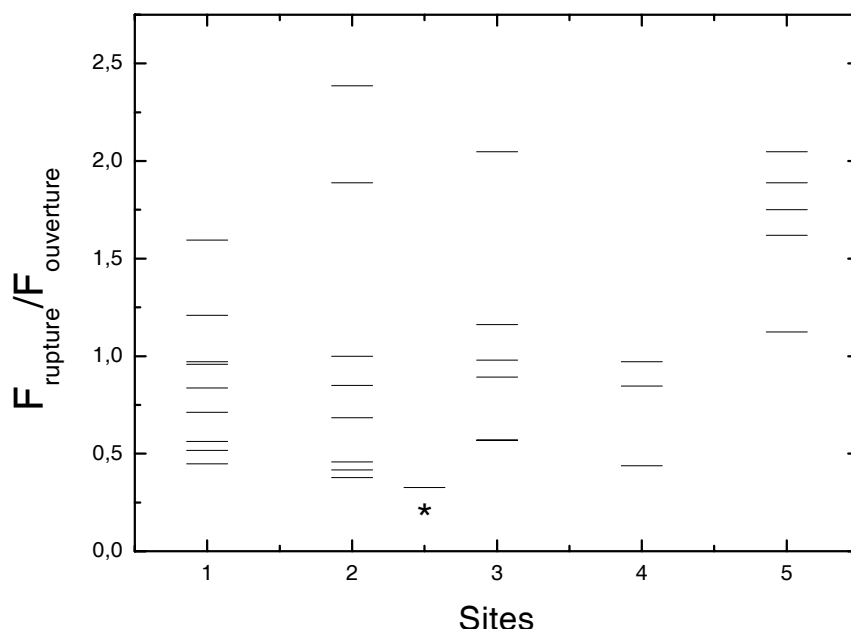


FIG. 7.4 – Rapport entre la force F_r nécessaire pour dissocier l'enzyme de l'ADN, et la force d'ouverture, pour chacun des pics observés, en fonctions des sites sur lesquels les pics ont été détectés. Le symbole * correspond au second site "étoile" (cf. tableau 1) sur lequel un pic a été observé.

$$K_D = \frac{[\text{site}][\text{protéines}]}{[\text{protéine} - \text{site}]}$$

où, pour un site donné, [site] désigne la concentration de sites inoccupés, [protéine] la concentration de protéines libres et [protéine-site] la concentration de sites occupés. Cette formulation est juste uniquement à l'équilibre, et est indépendante de la hauteur de la barrière entre les deux états. Ce calcul est effectué par Koch et al. [120]. Il faut connaître avec une bonne précision les concentrations de protéines et d'ADN utilisées. Nous n'avons pas déterminé la concentration de l'enzyme, et il est difficile d'estimer la concentration d'ADN car la construction utilisée est plus compliquée que celle de Koch et al., et la quantité de constructions "correctes" à la fin de la préparation est très inférieure à la quantité d'ADN initialement introduite.

L'énergie libre de la réaction est aussi un paramètre important. Certains résultats obtenus sur *EcoR* V [130] et l'endonucléase de type II *BamH* I [131] sont rassemblés dans le tableau suivant² :

²Dans les deux cas les expériences sont réalisées avec du Ca^{2+}

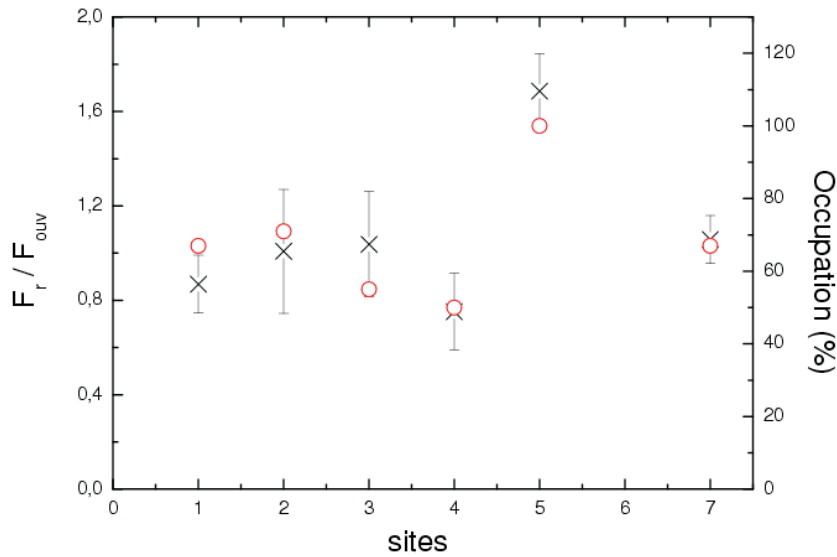


FIG. 7.5 – Corrélation entre le niveau de force de rupture moyen (croix) et le pourcentage d'occupation d'un site (ronds). Les cinq premiers points correspondent aux cinq sites explorés dans l'expérience et le dernier point à la moyenne sur les cinq sites. Les barres d'erreur (déviations standard) sont associées au niveau de force moyen.

	<i>EcoR V</i>	<i>BamH I</i>
NS : ΔG	-17 kT	-12 kT
NS : K_D	40 nM	8.3 mM
S : ΔG	-24 à -27 kT	-22 à -25 kT
S : K_D	*0.02-0.002 nM	0.01-0.25 nM

Tableau 3 : constante de dissociation K_D mesurée ou *estimée pour *EcoR V* (pH 7.5, 25°C) et *BamH I* (pH 7.3, 21 °C), et énergie de dissociation ΔG associée, obtenues par la relation : $\Delta G = RT \ln K_D$. ; NS et S désignent respectivement des sites non spécifiques et spécifiques.

Quelle est la relation entre la valeur du pic de force et la constante de dissociation ? Considérant que la force s'exerce sur une distance d correspondant à l'empreinte de la protéine sur l'ADN, un travail est exercé durant l'ouverture de la double hélice. Sur la figure 7.6 est représentée la forme que peut prendre le potentiel dans ce type de réaction de dissociation. L'application d'une contrainte mécanique déforme le potentiel, abaissant la barrière d'énergie à franchir pour s'échapper de l'état lié. Si l'on suppose que le travail fourni constitue la seule forme d'énergie disponible pour franchir la barrière, on doit vérifier : $\Delta W < -\Delta G$. En supposant que la force s'applique sur la séquence spécifique de six bases (≈ 2 nm), on obtient une énergie :

$$\langle \Delta W \rangle \approx 15kT(\pm 10) \cdot 2nm \approx 7kT(\pm 5)$$

La valeur moyenne de 7 kT est sans doute sous-estimée car : (i) elle ne tient pas compte des contacts sur les séquences adjacentes, or des travaux indiquent que l'interaction spécifique s'étend sur 12-14 bases ([122] et références 41, 42, 45 de [130]); (ii) les conditions de tampon

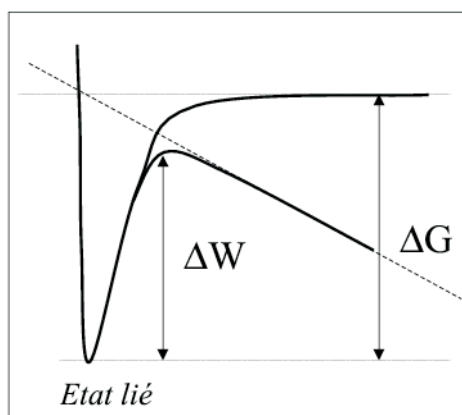


FIG. 7.6 – Déformation de l'énergie de liaison sous l'effet d'une force [133]. Pour éjecter l'enzyme, il faut fournir un travail ΔW inférieur à ΔG .

ne sont pas optimales : le pH de la solution a notamment une influence, une baisse du pH augmentant l'affinité pour un site spécifique sans modifier celle des sites non spécifiques³ ; Reid et al. [130] ont mesuré une baisse de $\sim 50\%$ du K_D en variant le pH de 7.5 à 7.2. Or le pH est ajusté à 8 dans les expériences présentées ici, contre 7.3 et 7.5 pour les résultats reportés dans le tableau 3. En prenant $d=13$ bases, la gamme 5-25 pN de F_r correspond à une énergie ΔW comprise entre 5 et 27 kT, ce qui se rapproche des données du tableau 3.

7.2.4 Temps et vitesse

Aucun effet lié à la vitesse d'ouverture n'a été observé dans la gamme 0.5 - 5 $\mu\text{m/s}$ (*i.e.* 0.5 à 5 kb ouverts par seconde). On remarque que le "temps de dissociation" (*i.e.* le temps mesuré entre le début de la montée de force et la chute brutale associée à l'éjection de la molécule), à 500 b/s dépend du site : cela est dû à l'élasticité du simple brin qui rend la construction moins raide au cours de l'ouverture (cf. figure 7.2) ; en effet, la force monte d'autant plus vite pour un déplacement donné que le système est raide.

7.2.5 Quelques perspectives

Par cette méthode et en utilisant une construction adaptée, on peut envisager d'étudier les effets des séquences adjacentes. On peut aussi espérer apporter des informations sur le mode de transport de l'enzyme sur l'ADN (diffusion ou "jumping") en étudiant l'occupation statistique des sites. Enfin, on peut appliquer l'expérience à d'autres enzymes se fixant sur l'ADN comme les protéines à "doigt de zinc" par exemple.

³Les protons agissent comme les ions divalents, en atténuant la répulsion électrostatique dans le site actif de l'enzyme.

Chapitre 8

Conclusions

L'étude par mesure directe de force durant la transcription de l'ARN polymérase du bactériophage T7 a permis de dégager les caractéristiques de l'enzyme soumise à une contrainte mécanique dans la gamme 5-20 pN. Cette protéine constitue un modèle pour l'étude des moteurs moléculaires. Le travail effectué a permis notamment de conclure que l'avancée de l'enzyme sur l'ADN est couplée à la fixation du nucléotide dans le site actif. En particulier, l'énergie dégagée lors de l'hydrolyse du NTP n'est donc pas directement utilisée sous forme d'énergie mécanique.

La diminution de la concentration en ion magnésium agit sur une étape qui n'est pas liée au mouvement, et qui est supposée être associée à l'hydrolyse du nucléotide.

Les résultats font apparaître par ailleurs un effet non Michaelien pour des concentrations en NTP inférieures à $\approx 50 \mu\text{M}$, suggérant pour la polymérase l'existence de deux états dépendants de la concentration en NTP.

Enfin, le dépliement d'une partie du domaine N-terminal de la protéine est parfois observé durant l'expérience. Ce dépliement stoppe l'avancée de la polymérase de façon réversible : une réduction de la force de charge vers zéro piconewton permet en effet la recombinaison du domaine et la reprise de l'activité enzymatique.

Les homologies de séquences, ainsi que les similitudes dans le mécanisme général de transcription et les structures tridimensionnelles entre les différentes polymérases, à une ou plusieurs sous-unités, suggèrent que le mécanisme de translocation est également partagé, ce qui permet de proposer que pour les polymérases en général, c'est l'étape de liaison du nucléotide dans le site actif qui est associée au mouvement de la polymérase sur l'ADN.

L'expérience d'ouverture de l'ADN à différentes vitesses a permis de mettre en évidence l'effet de la friction lors de la rotation de la molécule. Dans la configuration utilisée, les résultats expérimentaux indiquent que la friction subit par l'ADN est de l'ordre de 1 kT par 10000 bases pour une fréquence de 2000 tours par secondes, i.e. environ 10 fois la valeur estimée pour une corde solide et droite. Ce résultat est à replacer dans la problématique "d'action à distance" d'une enzyme en rotation sur l'ADN.

Enfin, les expériences réalisées sur l'enzyme *EcoR V* ont mis en évidence une grande variabilité

dans l'énergie de dissociation, liée à des différences d'affinités entre les sites. L'origine de ces différences n'a cependant pas encore été déterminée.

Chapitre 9

Annexes

9.1 Le bactériophage T7

Le bactériophage (cf figure 9.1) infecte la bactérie *E. coli*, et produit, par cellule après un cycle d'infection, environ une centaine de descendants et ceci en ~ 25 minutes à 30°C . Son génome qui correspond à 39937 paires de bases, comporte 56 gènes qui codent 59 protéines connues. Tous les gènes sont transcrits à partir du même brin d'ADN, les séquences codantes occupent 92% du génome.

On distingue trois classes de gènes : ceux de classes I, II ou III. Les gènes de classe I sont ceux qui sont exprimés les premiers entre 2 à 8 minutes après l'infection et sont transcrits par l'ARN polymérase d'*E. coli* : ils permettent de modifier les fonctions de la cellule hôte afin de produire des nouveaux phages. Parmi ces gènes, le gène 1 code pour l'ARN polymérase de T7. Les gènes de classe II sont transcrits entre 6 et 15 minutes après l'infection par cette ARN polymérase de T7 et servent essentiellement à la réplication de l'ADN phagique ; un de ces gènes exprime le Lysozyme de T7, protéine qui régule l'expression génétique du phage. Enfin, les gènes de classe III sont exprimés à partir de 8 minutes post infection et ce jusqu'à la lyse de la cellule (environ 25 minutes) ; elles expriment principalement des protéines impliquées dans la morphogénèse et la synthèse de la capsid virale (encapsidation, maturation...).

Les ADN répliqués sont encapsidés avec d'autres protéines phagiques, le tout est libéré lors de la lyse brutale de la cellule hôte.

9.2 La préparation des polymérases

Les polymérases "sauvages" ou modifiées utilisées pour notre travail ont été préparées par Pascal Lopez. On décrit ci-dessous les étapes de la préparation de la protéine de fusion "ARNPT7-biotine" utilisée dans les expériences présentées dans le manuscrit. Pour insérer une biotine, on ajoute à la suite de l'extrémité N-terminale de la protéine une séquence spécifique d'acides aminés formant une cible reconnue par une protéine (la biotine-ligase) qui va biotinyler *in vivo* un acide aminé de la séquence de reconnaissance.

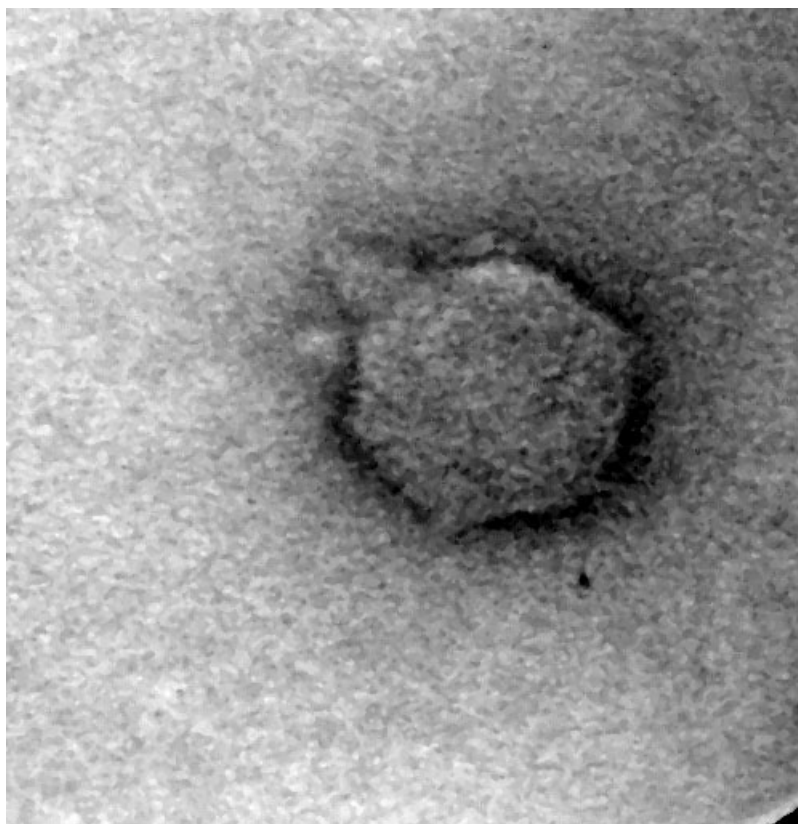


FIG. 9.1 – *Bactériophage T7 vu par microscopie électronique. On distingue la tête et la courte queue du phage. Cette dernière se fixe sur un récepteur membranaire de la cellule hôte. L'ADN encapsidé dans la tête est ensuite introduit dans le cytoplasme de la cellule infectée.*

La préparation se déroule en trois grandes étapes : (i) la préparation du fragment d'ADN codant pour l'ARNPT7-biotine, (ii) l'expression puis (iii) la purification de la protéine.

9.2.1 Préparation du fragment codant pour l'ARNPT7-biotine

Le plasmide de départ est le pHB161. Il contient la séquence codant pour la protéine His-tagged ARNPT7. La première étape consiste à insérer la séquence codante dans un autre plasmide. Pour cela, le pHB161 est coupé par *BamH* I ; le fragment contenant la séquence codante et les séquences adjacentes est récupéré et cloné dans le plasmide pUC19. Ce nouveau vecteur est appelé pUCT7RNAP. L'étape suivante consiste à remplacer la séquence codant le His-tag (12 Histidines) par une séquence qui permet la fixation de la biotine. Le vecteur pUCT7RNAP est tout d'abord coupé par *Nco* I et *Xba* I ; la région enlevée est remplacée par deux oligonucléotides complémentaires codant la séquence d'acides aminés suivante : MAGGLNDIFEAQKMEWRLE (la lysine K soulignée portera la biotine). Cette séquence est placée juste en amont de la séquence codante de l'ARNPT7. Pour vérifier la bonne insertion, la plasmide obtenu que l'on nomme pBio-ARNPT7 est séquencé.

9.2.2 Expression

Le plasmide pBio-ARNPT7 contient la séquence codant pour l'ARNPT7-biotine ainsi qu'un gène de résistance à un antibiotique ¹. Ce plasmide est utilisé pour transformer la souche *E. coli* AVB101 (Avidity, L.L.C.) contenant déjà un autre plasmide : un dérivé de pACYC184 qui contient le gène *birA* qui, en présence d'un sucre (l'IPTG), permet la surexpression de la biotine-ligase. Cette biotine-ligase est capable de liguer une biotine sur un acide aminé en reconnaissant la séquence d'acides aminés qui a été ajoutée à l'extrémité N-terminale de l'ARNPT7. La souche est mise en culture en présence de deux antibiotiques permettant de maintenir les deux plasmides introduits. Au milieu de l'étape de croissance est ajouté dans le milieu de culture 1 mM d'IPTG et 50 μ M de biotine. La croissance est prolongée trois heures : le gène *birA* est alors exprimé, et les biotine-ligases attachent la biotine sur la lysine de la séquence insérée.

9.2.3 Purification

Pour séparer les ARNPT7-biotine des autres protéines, le contenu des souches est passé sur une colonne d'avidine monomérique (softLink column, Promega) : les ARNPT7 portant une biotine sont alors retenues sur la colonne. Après lavage, les protéines sont ensuite récupérées par élution en introduisant de la biotine en excès (l'équilibre chimique est déplacé et les ARNPT7 se détachent de la colonne) dans le tampon suivant : 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.05% Triton X100, 5% glycérol, 20 μ g/ml PMSF et 8 mM de biotine.

La protéine est ensuite concentrée par Centricon, puis dialysée de façon extensive dans le tampon d'élution sans biotine. Elle est finalement stockée dans 20 mM PB pH 7.7, 1 mM EDTA, 1 mM DTT et 50% glycérol par aliquots à -80°C.

9.3 Protocoles pour une expérience de transcription

9.3.1 Les différentes stratégies d'attachements spécifiques et non spécifiques

Adsorption des complexes

Lors des premières expériences, on a tenté d'immobiliser la polymérase à la surface par adsorption. Dans une solution peu salée (10 mM NaCl) on a observé que la polymérase s'adsorbe sur une surface de verre. Une fois les complexes arrêtés déposés sur la surface, on voit en effet des "événements" (billes attachées à l'ADN tenu par une polymérase adsorbée sur la surface) bien caractéristiques (ces événements ne sont pas observés en présence d'ADN et de billes seuls). Cependant, l'ajout de nucléotides pour redémarrer la transcription fait disparaître les événements avec une constante de temps de l'ordre de la minute. De plus, aucune activité de l'enzyme n'a été détectée même avec une faible contrainte mécanique².

¹L'introduction de l'antibiotique ampicilline permet de sélectionner les souches de bactéries qui ont intégré le plasmide

²Il est possible d'observer une transcription en imposant une contrainte mécanique très faible (10^{-2} pN) en maintenant un flux constant dans l'échantillon : la bille s'immobilise quand l'ADN est étendu ; si la polymérase transcrit, la distance entre le point d'ancrage de la polymérase et la bille diminue ; et en observant au microscope la position de la bille, on détermine s'il y a transcription ou pas.

L'ARNPT7 étant une protéine à une sous-unité, on suppose que l'adsorption sur la surface la rend incompétente³. Cette stratégie a donc été abandonnée.

Attachements spécifiques

Ces échecs nous ont conduit à choisir un attachement spécifique. Deux configurations ont tout d'abord été testées : une protéine de fusion polymérase-GFP⁴ sur surface recouverte d'anti-GFP, et une protéine de fusion polymérase-biotine (préparée suivant le protocole indiqué dans la partie précédente) sur surface recouverte de streptavidine. Ces deux protéines ont été préparées spécialement par P. Lopez. La seconde configuration présentait un avantage : il nous était possible de tester l'efficacité des surfaces en préparant des billes recouvertes d'anti-digoxygénine et d'utiliser les constructions d'ADN λ Dig-Biot portant une biotine à une extrémité et un groupement digoxygénine à l'autre extrémité. Dans la seconde configuration, il était impossible d'effectuer ce contrôle car nous n'avions pas de moyen simple d'obtenir une construction d'ADN portant une protéine GFP à une extrémité.

La configuration GFP/anti-GFP n'a donné aucun résultat, et nous n'avons pas été capables d'identifier l'origine de cet échec. Cependant, la deuxième configuration (streptavidine/biotine) s'est révélée efficace, et c'est donc celle qui a été adoptée.

9.3.2 Polymérase biotinylée sur surface recouverte de streptavidine

Le protocole exact utilisé dans les expériences présentées dans la thèse est décrit ci-dessous. Deux tampons sont utilisés :

Le tampons 1 (TP1, utilisé notamment pour l'initiation) :

40 mM Tris-acétate pH 7.9, 8 mM Mg acétate, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA

et le tampons 2 (TP2) :

40 mM Tris-acétate pH 7.9, 8 mM Mg acétate, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50 mM KGlu

Le stock de polymérases (24 μ M) est conservée à -80°C dans 20 mM PB pH 7.7, 1 mM EDTA, 1 mM DTT et 50 % glycérol. Des aliquots sont ensuite conservés à -20°C pendant quelques mois. Pour une série d'expériences, on la dilue préalablement :

5 % glycérol

TP1 1x

ARNPT7 \sim 400 nM

Cette pré-dilution est stockée sur glace la journée. La préparation se déroule ensuite en trois étapes :

1. élaboration du complexe ADN-polymérase arrêté en +15
2. purification par centrifugation sur gradient de sucrose
3. dépôt sur la surface

³Cette méthode a été utilisée avec succès pour l'étude de l'ARNP d'*E. coli* [64, 66].

⁴GFP : Green Fluorescent Protein ; cette protéine est généralement utilisée comme marqueur fluorescent.

Pour obtenir des complexes arrêtés, on ne fournit à la polymérase que trois nucléotides (A, C, G). Le complexe arrêté en +15 (la seizième incorporation demandant un U) n'est stable que quelques minutes [29]. Pour augmenter cette stabilité, un raffinement empirique a été trouvé : on ajoute dans la solution du mélange initial (bille + polymérase + ADN + 3 NTP) ainsi que dans le gradient de sucrose, une faible concentration de UDP (10 μ M) pour la raison suivante : la polymérase peut accueillir ce nucléotide diphosphate dans le site actif car c'est un uracile (UTP) qui est attendu en +16 ; mais l'UDP n'est pas incorporable dans la chaîne d'ARN car non hydrolysable par la polymérase. On suppose que l'UDP pourrait maintenir la polymérase dans un état compétent, tout en étant arrêtée. La concentration finale d'UDP dans le puits (<4.5 μ M) est considérée comme négligeable devant les autres concentrations en nucléotides. Des améliorations sensibles (particulièrement le nombre de complexes arrêtés qui acceptent de "repartir" quand on ajoute les quatre nucléotides) ont été observées dans nos expériences avec cet ajout.

Elaboration du complexe ADN-ARNPT7-bille :

On mélange :

-0.45 μ l TP1 10x

-1 μ l de (ATP+GTP+CTP+UDP) à 2mM chaque.

-1 μ l de polymérases pré-diluée (\sim 400 nM)

-1 μ l d'ADN à \sim 3 nM

-1 μ l de billes (\sim 10⁵ billes/ μ l)

On laisse incubé 1 min dans la main.

Purification des complexes par centrifugation :

On mélange les 4.5 μ l avec 15 μ l de TP1. On dépose les 20 μ l sur un gradient de sucrose à 5 étages :

162 μ l à 7%, 41 μ l à 6%, 5% et 3% de glucose

20 μ l à 1% de glucose, les 7% étant au fond du tube.

La solution de sucrose utilisée est dans du TP1, avec 10 μ M d'UDP.

On centrifuge 1 min 40 à 2000 rotations par minutes (RPM) (260-360 m.s⁻²)

Incubation sous lamelle :

On retire 75 μ l de surnageant puis on dépose les 75 μ l suivants sur une surface recouverte de streptavidine et pré-mouillée avec du TP2. On laisse 3 min à température ambiante, puis 1 min sur le plateau à 27°C. On ajoute ensuite aux 75 μ l contenus dans le puits 85 μ l de TP2 à 27°C.

Pour redémarrer la transcription, on ajoute 10 μ l d'une solution concentrée de NTP.

Remarque : pour les expériences dans lesquelles on étudie l'influence du magnésium (page 93), on ajoute de l'acétate de Magnésium avec les quatre nucléotides au moment du "redémarrage" de la transcription arrêtée en +15. Ainsi, seule l'étape d'élongation est affectée par le changement de concentration en magnésium.

9.3.3 Purification des complexes

Dans cette partie, on présente les expériences mises en place pour séparer les "constructions entières" ADN+ bille + polymérase des éléments restés libres et gênants pour le bon déroulement de l'expérience (cf 4.1.2). On présente ensuite une mesure originale de la friction longitudinale de l'ADN.

Ultracentrifugation

Une première méthode a consisté à séparer les polymérases libres des complexes ADN-polymérase-billes, par ultra-centrifugation. Le mélange ADN+polymérase, après incubation quelques minutes à température ambiante, est déposé sur un gradient discontinu de sucrose de 1% à 13%. On utilise en effet un petit contenant (dimensions) pour l'ultracentrifugation ne permettant pas l'élaboration d'un gradient continu. En centrifugeant à 54000 tours par minute (325 000 g), on récupère, au bout de ~ 1 heure, au fond du tube, les complexes ADN-polymérase et les ADN libres ($PM = 30000$ kg/mol), les polymérases libres ($PM = 97$ kg/mol) restant en surface. Le temps de centrifugation est malheureusement beaucoup trop long devant le temps de vie d'un complexe arrêté [54].

Purification en présence de billes

Pour accélérer la séparation des complexes et des éléments libres, des purifications sur les mélanges ADN-polymérase-billes ont été testées. La bille étant très lourde devant les masses de l'ADN et de la polymérase, le temps de centrifugation est réduit. La force de friction s'exerçant sur la bille est donnée par la formule de Stokes :

$$f = 6\pi\eta a.v$$

où η est la friction du fluide, a le rayon de la bille et v sa vitesse. La faible valeur du nombre de Reynolds ($\approx 10^{-5}$) permet de négliger l'accélération de la bille. Sa vitesse v est donc toujours la vitesse d'équilibre, obtenue par l'égalité :

$$F = mg = 6\pi\eta av$$

où m est la masse de la bille, et F la force centrifuge appliquée. Pour atteindre une vitesse de l'ordre de 1cm par min (vitesse pour traverser un eppendorf dans un temps raisonnable du point de vue de l'expérience) dans un liquide à viscosité comparable à celle de l'eau, il faut appliquer une force F de l'ordre du pN sur la bille. La masse de cette dernière étant de l'ordre du pg, une accélération :

$$a = F/m = 1pN/1pg = 1000N/kg \approx 100g$$

est nécessaire pour atteindre cette vitesse. Cette accélération peut être atteinte par des petites centrifugeuses de laboratoire : il suffit de faire tourner l'échantillon à ≈ 1000 rotations par minute (RPM), à ≈ 10 cm de l'axe de rotation.

Cependant, les essais effectués sur une telle centrifugeuse n'ont pas été concluant. En effet, celles disponibles ne possèdent pas de bras verticaux : lors de la centrifugation, quand elles atteignent la paroi du tube, les molécules s'y adsorbent et ne longent pas la surface de l'éppendorf. Pour remédier à ce problème, nous avons fait fabriquer des pièces à adapter sur la centrifugeuse : les tubes sont maintenus par des bras articulés en position vertical au repos ; sous l'effet de l'accélération centrifuge, les bras s'inclinent dans la position horizontale. Ainsi, les billes ont toujours un mouvement dirigé dans l'axe du tube et n'ont pas tendance à se coller sur les parois latérales de celui-ci.

La gain est grand : les ADN et polymérases libres (ou complexes ADN-polymérase sans bille) restent à la surface (PM trop petit) et en choisissant les bons paramètres de temps et de vitesse de rotation, on sépare aussi les billes libres des billes attachées à l'ADN. En effet, lors de la centrifugation, la bille, attirée vers le fond du tube, va entraîner l'ADN accroché avec elle et le dérouler. L'ADN va donc subir lui aussi une force de friction de la part du fluide, sur toute sa longueur. Cette friction du fluide sur l'ADN s'ajoute à la friction sur la bille, ralentissant la vitesse de progression de l'ensemble par rapport à une bille seule. Dans des conditions optimisées, les éléments sans bille sont en surface, les ADN ancrés aux billes se trouvent dans une fraction intermédiaire, et les billes seules sont au fond du tube.

friction latérale exercée sur l'ADN

Indirectement, il est donc possible de mesurer la friction latérale exercée le long de l'ADN, en comparant les vitesses de sédimentation des billes libres et des billes accrochées à l'ADN, lors d'une centrifugation. Pour savoir où ont migré les billes après une centrifugation, on prélève des fractions du gradient que l'on dépose sur des surfaces différentes pour chaque fraction, puis on compte au microscope le nombre moyen de billes observée par champs de vue. Pour savoir si de l'ADN est attaché aux billes, les fractions sont déposées sur des surfaces recouvertes de streptavidine qui permettent l'accrochage de l'ADN⁵ à la surface. En appliquant un écoulement dans l'échantillon (cf partie 4.1.2), on compte le nombre d'événements ADN-billes ancrés à la surface, pour chaque fraction.

La préparation du gradient de sucrose consiste en un empilement de 8 étages de sucrose : 41 μ l à 10, 9, 8, 7, 6, 5 et 3%, 20 μ l à 1% de sucrose.

Expérience avec des billes seules

Une première expérience témoin de centrifugation avec uniquement des billes permet de (i) vérifier qu'il n'y a pas d'écoulement particulier qui perturbe la migration des billes vers le fond du tube, (ii) de vérifier que la friction mesurée sur la bille correspond à la friction théorique.

Les résultats d'une centrifugation de 60s à 3000 RPM sont donnés dans le tableau suivant.

⁵On utilise un ADN λ portant une biotine à un bout et une Digoxygénine à l'autre bout ; les billes sont recouvertes d'Antidigoxygénine.

fraction	volume prélevé	nombre de billes
1	140	0 %
2	80	1 %
3	50	3 %
4	50	16 %
5	<50	80 %

Le nombre de billes est donné en pourcentage du nombre total de billes observées dans les cinq fractions. La fraction 5 correspond au fond du tube.

La grande majorité des billes (80 %) atteint le fond dans la minute. En mesurant la distance parcourue pour atteindre la fraction du fond, on estime la vitesse⁶ des billes à $V_b^{3000} \approx 20\text{mm} / 60\text{s} \approx 330 \mu\text{m/s}$. La vitesse moyenne théorique, calculée en fonction de la distance à l'axe de rotation, de la viscosité et la densité du fluide suivant le pourcentage de sucre, et de la densité théorique des billes, est $\sim 300 \mu\text{m/s}$ à 10°C et $\sim 400 \mu\text{m/s}$ à 20°C . La température n'était pas un paramètre contrôlé à l'époque à laquelle cette expérience a été menée. Cependant, la température de la pièce étant peu élevée et les solutions de sucre étant stockées au réfrigérateur, l'ordre de grandeur estimé est tout à fait satisfaisant.

Expérience avec l'ADN

On rapporte dans les deux tableaux suivants les résultats de deux expériences de centrifugation en présence de billes et d'ADN. La première est effectuée avec 3000 RPM pendant 60s, et la seconde avec 1000 RPM pendant 9 minutes. On rappelle que l'on entend par "événement" l'observation de l'ancrage d'une construction ADN-bille à la surface.

fraction	volume prélevé	billes	événements
1	100	0	0
2	<100	0	0
3	≈ 50	40-55 %	0
4	≈ 50	15-50 %	0
5	≈ 50	15-30 %	0

Après une centrifugation de 60s à 3000 RPM, on dépose les différentes fractions du tubes sur des surfaces pour estimer la quantité de billes et la quantité de construction ADN-bille (observation d'un "événement"). La fraction 5 correspond au fond du tube. Le nombre de billes et d'événements sont donnés en pourcentage du nombre total de billes et d'événements observés dans les cinq fractions. Dans cette expérience, toutes les molécules d'ADN se sont détachées des billes.

⁶On adopte la notation V_n^x ; l'indice n désigne l'objet : b pour bille et $b + \text{ADN}$ pour bille-ADN, et l'exposant x désigne le nombre de rotations par minute

fraction	volume prélevé	billes	événement
1	≈ 100	2 %	2 %
2	≈ 60	15-25 %	69 %
3	≈ 60	15-50 %	11 %
4	≈ 60	15-50 %	9 %
5	≈ 60	15-25 %	9 %

Même expérience avec 1000 RPM pendant 9 minutes. Des événements sont observés, en grande majorité dans la fraction 2.

Concernant la première expérience, on remarque que : (i) les résultats diffèrent de l'expérience sans ADN, bien que l'on ait gardé les mêmes paramètres (3000 RPM et 60s de centrifugation) ; (ii) aucun événement n'est observé : les ADN ont dû se décrocher avant la fin de la centrifugation. L'étalement de la distribution de billes sur les 3 dernières fractions peut s'interpréter de la manière suivante : les ADN accrochés aux billes migrent plus lentement que les billes seules ; mais avec 3000 RPM, la force de friction exercée brise les attachement ADN-bille au bout de quelques secondes ou dizaines de secondes.

Dans la seconde expérience, la rotation plus lente est supposée garder les attachements ADN-billes jusqu'à la fin. En contrepartie, il faut faire migrer plus longtemps (vitesse théorique de migration d'une bille libre pour 1000 RPM : $\approx 50 \mu\text{m/s}$). L'hypothèse faite plus haut se confirme : la majorité des événements observés se trouvent dans une fraction supérieure (la deuxième), alors que la densité totale de bille n'y est pas maximale ; on observe un étalement de la distribution de billes dans les fractions inférieures 2 à 5. On peut estimer la vitesse de migration d'une bille avec un ADN, en mesurant la distance parcourue pendant les neuf minutes pour aller dans la fraction 2 : $11 \mu\text{m/s} < V_{b+ADN}^{1000} < 18 \mu\text{m/s}$.

La force de friction est donc un paramètre important à maîtriser : elle ne doit pas être trop grande et appliquée trop longtemps si l'on veut garder un nombre suffisant d'ADN accrochés aux billes au sortir de la centrifugation. Pour 1000, 2000 et 3000 RPM, la force exercée sur la bille vaut respectivement : 0.4, 1.5 et 3 pN (formule de Stokes).

On présente maintenant la même expérience avec 2000 RPM pendant 2 minutes 15.

fraction	volume prélevé	billes (%)	Evénements (%)
1	≈ 100	10	19
2	≈ 80	41	74
3	≈ 60	19	4
4	≈ 60	24	0
5	≈ 60	6	3

Résultats après une centrifugation de 2 minutes 15s à 3000 RPM. La fraction 5 correspond au fond du tube. Le nombre de billes et d'événements sont donnés en pourcentage du nombre total de billes et d'événements observés dans les cinq fractions.

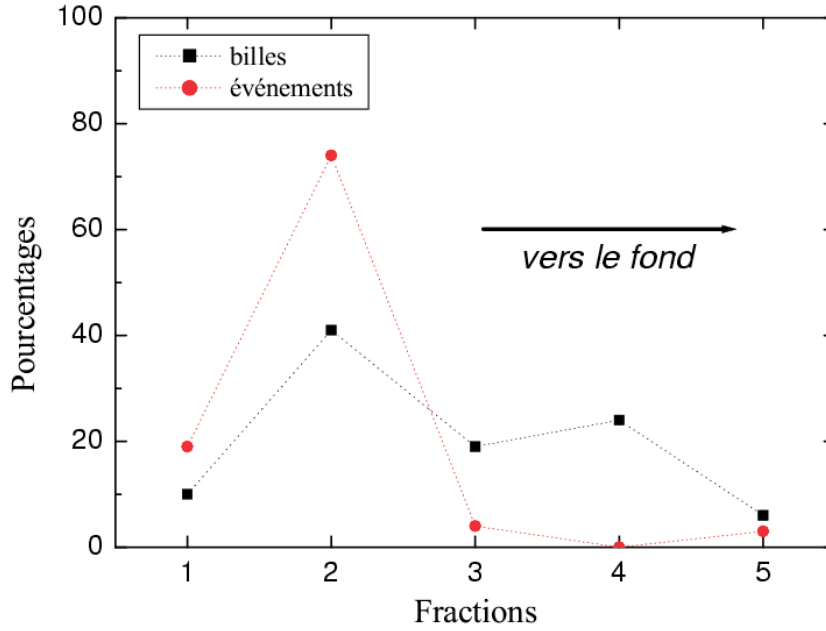


FIG. 9.2 – Analyse des différentes fractions prélevées après une centrifugation à 2000 RPM pendant 2 minutes 15 : répartition (en pourcentage) du nombre de billes et d'événements (ADN+bille) suivant la fraction observée. Les ADN ancrés aux billes migrent lentement et se trouvent dans une fraction supérieure (2) ; les billes libres et/ou qui ont perdu leur ADN sont réparties dans les fractions suivantes (3, 4 et 5).

Sur la figure 9.2, on représente les résultats de cette expérience, représentative des observations déjà faites pour les deux précédentes expériences.

Ici, on estime la vitesse d'une bille attachée avec de l'ADN : $37\mu m/s < V_{b+ADN}^{2000} < 59\mu m/s$.

Estimation de la force de friction sur l'ADN

Dans les équations du mouvement, on néglige le terme d'accélération (voir précédemment). Pour une bille seule, on a :

$$m_b \tilde{g} = f_b = 6\pi\eta a < V_b^{RPM} >$$

où f_b est la friction exercée sur la bille, m_b est la masse de la bille, \tilde{g} est l'accélération centrifuge, η la viscosité du fluide, a le rayon de la bille et $< V_b^{RPM} >$ la vitesse d'équilibre de la bille. Dans le cas d'une bille attachée avec un ADN, on suppose que la friction totale est la somme des frictions sur la bille (f_b) et sur l'ADN (f_{ADN}). Dans ce cas on a :

$$m_{b+ADN} \tilde{g} = f_b + f_{ADN} = 6\pi\eta a < V_{b+ADN}^{RPM} > + f_{ADN}$$

Or, la masse de la bille est largement supérieure à celle de l'ADN, donc :

$$m_b \tilde{g} \simeq 6\pi\eta a < V_{b+ADN}^{RPM} > + f_{ADN}$$

On en déduit :

$$6\pi\eta a \langle V_b^{RPM} \rangle \simeq 6\pi\eta a \langle V_{b+ADN}^{RPM} \rangle + f_{ADN}$$

On peut alors montrer que :

$$\frac{f_{ADN}}{f_b} \simeq \frac{\langle V_b^{RPM} \rangle}{\langle V_{b+ADN}^{RPM} \rangle} - 1$$

Les valeurs de $\langle V_b^{RPM} \rangle$ sont estimées à partir de la valeur mesurée sur la première expérience avec les billes seules. Pour 1000 RPM, on calcule alors : $1.1 < \frac{f_{ADN}}{f_b} < 2.5$, et pour 2000 RPM : $1.6 < \frac{f_{ADN}}{f_b} < 3.1$. On en déduit :

$$1.6 \lesssim \frac{f_{ADN}}{f_b} = \kappa \lesssim 2.5$$

D'après Meiners et Quake [143], pour un ADN λ étiré, la friction longitudinale vaut :

$$f_{Meiners} = 8 \cdot 10^{-9} \cdot V_{flux}$$

où V_{flux} est la vitesse du flux imposée, i.e. la vitesse de sédimentation pour notre expérience. La formule générale de Cox [72] donne la friction longitudinale d'un polymère de rayon R et longueur L dans un flux :

$$f_{Cox} = \frac{4\pi\eta V_{flux} L}{\ln(L/R) + 0.81}$$

Soit pour l'ADN λ ($L=16.4 \mu\text{m}$, $R=1 \text{ nm}$), et prenant $\eta \simeq 1 \cdot 10^{-3} \text{ kg.m/s}$:

$$f_{Cox} \simeq 20 \cdot 10^{-9} \cdot V_{flux}$$

D'après l'expérience de centrifugation, on a : $f_{ADN} = \kappa \cdot 6\pi\eta a \cdot V_{flux}$, soit :

$$15 \cdot 10^{-9} V_{flux} < f_{ADN} < 24 \cdot 10^{-9} V_{flux}$$

Dans les trois cas les ordres de grandeur sont comparables. Les résultats obtenus sont plus proches des prévisions théoriques générales de Cox que des résultats expérimentaux de Meiners et Quake. Une critique peut être adressée au raisonnement tenu jusqu'ici : il a été implicitement supposé depuis le début qu'une seule molécule d'ADN s'accrochait par bille. Comment peut-on en être sûr ? Les expériences à 1000 et 2000 RPM fournissent les meilleurs arguments : les ADN accrochés aux billes se trouvent dans une fraction supérieure, et toutes les billes des fractions inférieures sont libres. Or, s'il y avait plusieurs ADN par billes, on attendrait une distribution étalées des billes accrochées aux ADN sur plusieurs fractions. Des "événements" devraient donc être observables sur plusieurs fractions. De plus, la probabilité que n ADN soient attachés à une bille est supérieure à la probabilité qu'il y en ait $n+1$: les billes avec n ADN migrant plus vite que les billes à $n+1$ ADN, la plus basse des fractions où sont observés des événements doit correspondre à celle contenant les billes à un ADN d'une part, et contenant le plus d'événements

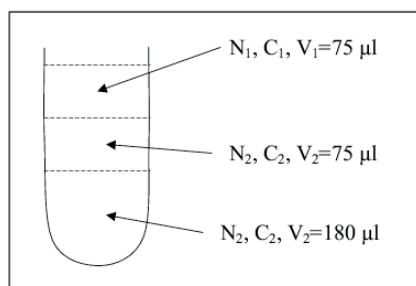


FIG. 9.3 – Schématisation des trois fractions prélevées après la centrifugation ; N_i représente le nombre de moles de nucléotides se trouvant dans la fraction i , C_i la concentration de nucléotides dans cette fraction et V_i le volume de la fraction. Pour déterminer la quantité de nucléotides dans chaque fraction, on prélève 5 μl de chaque fraction dont on mesure ensuite le taux de radioactivité.

observés d'autres part. Il est donc tout à fait probable que l'unique fraction où l'on observe les majorité des événements corresponde à la fraction des billes à un ADN.

Contrôle des imperfections éventuelles de la purification

Dans ce paragraphe on présente une expérience de contrôle prouvant que les nucléotides surnageants déposés sur le gradient de sucrose ne migrent pas par un phénomène incontrôlé (et non désiré) dans les fractions inférieures. Pour vérifier s'il existe de telles "fuites" lors de l'opération de centrifugation, trois tests ont été menés dans les conditions de l'expérience de transcription, en utilisant des nucléotides radioactifs. Le principe est de mesurer après centrifugation le taux de radioactivité dans les différentes couches du gradient de sucrose.

Dans les trois tests on mélange (pour la composition du tampon 1 et de la pré-dilution de polymérase, voir page 156) :

- 0.45 μl TP1 10x
- 1 μl de (ATP+GTP+CTP+UDP) à 2mM chaque.
- 1 μl de dilution de polymérase pré-diluée (~ 400 nM)
- 1 μl d'ADN à ~ 3 nM
- 1 μl de billes ($\sim 10^5$ billes/ μl)
- 0.5 μl de dATP- ^{33}P pour le test 1 et 1 μl de dATP ^{33}P pour les tests 2 et 3.

Le protocole concernant la centrifugation qui suit est décrit page 157. On récupère ensuite trois fractions : les 75 μl surnageants (fraction 1), les 75 μl suivants (fraction 2) et le reste du gradient, soit ≈ 200 μl (fraction 3). On dépose 5 μl de chaque fraction sur une membrane de nylon qui est ensuite exposée ~ 3 minutes sur une plaque qui mesure le rayonnement émis.

Un volume v issu d'une fraction i contient n_i moles de dATP marqués. On définit x_i , la proportion de dATP- ^{33}P se trouvant dans le volume v prélevé : x_i se déduit de la mesure d'intensité des taches sur la plaque. On a donc :

$$\sum n_i = \sum x_i \cdot n_{tot} = n_{tot}$$

Notant C_i la concentration de dATP- ^{33}P dans une fraction i , on définit une constante α :

$$C_i = \frac{n_i}{v} = x_i \frac{n_{tot}}{v} = \alpha x_i$$

Au départ, la quantité totale de NTP (non marqués) est :

$$N_{tot} = \sum N_i = 2 \text{ mM} \cdot 1 \mu\text{l}$$

et, en supposant que les NTP migrent en même proportion que les dATP- ^{33}P :

$$N_{tot} = \sum N_i = \sum C_i \cdot V_i = \alpha \sum x_i V_i$$

On en déduit :

$$\alpha = \frac{N_{tot}}{\sum x_i V_i} \simeq \frac{2 \text{ mM} \cdot 1 \mu\text{l}}{75x_1 + 75x_2 + 180x_3}$$

Les tests 1 et 3 donnent : $(x_1, x_2, x_3) = (0.94; 0.01; 0.05)$ et le test 2 donne : $(x_1, x_2, x_3) = (0.91; 0.04; 0.05)$. Dans chaque cas on détermine α , et on en déduit la concentration dans la fraction 2 (celle qui est déposée sur l'échantillon) ; on calcule $C_2 = 0.25 \mu\text{M}$ pour les tests 1 et 3 et $C_2 = 1 \mu\text{M}$ pour le test 2.

Lors de l'expérience, les $75 \mu\text{l}$ de la fraction déposée sont ensuite dilués dans $170 \mu\text{l}$ (cf protocole page 157). La concentration totale des nucléotides ayant "fuit" est donc comprise entre $0.1 \mu\text{M}$ et $0.45 \mu\text{M}$ au final dans le puits. Ces concentrations sont négligeables devant les plus petites utilisées ($10 \mu\text{M}$ [NTP]).

9.4 Préparations des constructions d'ADN

Les détails de la construction d'ouverture sont exposés dans la référence [119].

Les principes de la construction utilisée pour étudier la transcription sont illustrés sur la figure 9.4. Le matériel de départ est l'ADN λ qui contient environ 48 kb ($\sim 16 \mu\text{m}$), qui présente la particularité d'avoir 12 bases complémentaires non appariées à ces deux extrémités. Ces deux "prolongements" simple brin sont utilisés pour hybrider d'un côté un oligonucléotide (oligo) portant un groupement digoxygénine (oligo Dig), et de l'autre deux oligos contenant une séquence d'initiation de l'ARNPT7.

Les séquences des oligos A et B formant le promoteur, ainsi que celle de l'oligo Dig sont :

Oligo Dig :



Oligo A :



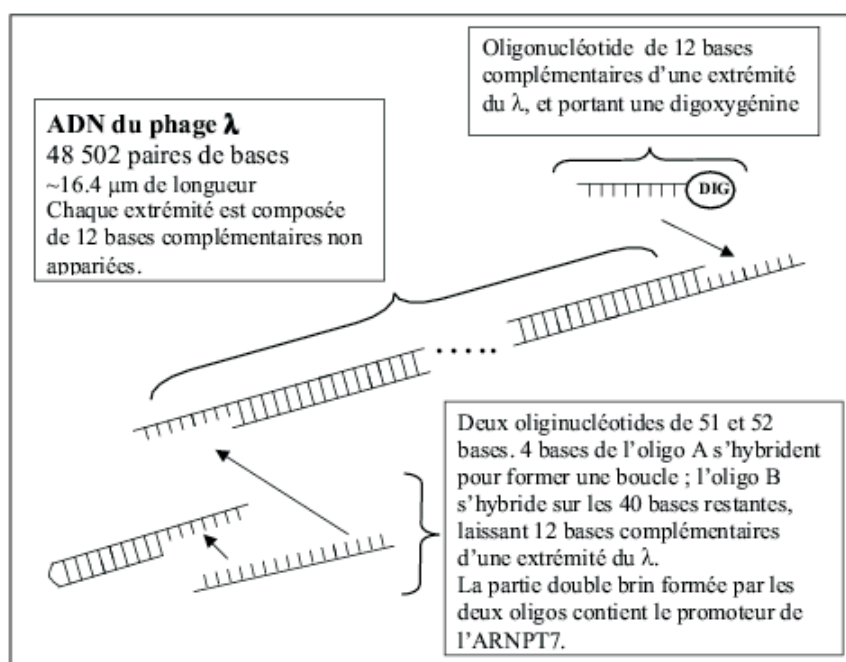


FIG. 9.4 – Schématisation de la construction utilisées dans les expériences de transcription.

Oligo B :

5' aggtcgccgcc aaaccgttggtgtctcc⁺¹ c tatagtgagtcgtattaatttc 3'

Les bases de l'oligo A s'hybrident pour former une épingle à cheveux sont soulignées. Les 12 bases complémentaires de l'extrémité du λ sont indiquées par des accolades.

Dans un premier temps, l'ADN λ est mélangé avec un excès de 30 pour 1 d'oligos A et B :

40 μl de λ 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

0.5 μl d'oligo A $2 \cdot 10^{-5}\text{M}$

0.5 μl d'oligo B $2 \cdot 10^{-5}\text{M}$

4.7 μl de tampon de ligase

Le mélange est fait à 65°C, puis refroidit jusqu'à température ambiante (en ~ 4 h). Suit une étape de ligation de 2 heures à température ambiante :

1 μl de ligase NEB 400 u/ μl

0.5 μl ATP 100 mM

La ligase est ensuite inactivée en portant le mélange à 65°C pendant 10 minutes.

Pour la seconde hybridation, on utilise un ratio de 90 :1 entre l'oligo Dig et l'ADN en ajoutant au mélange :

3 μl d'oligo Dig 10^{-5}M

Le mélange a lieu à 65°C et on laisse refroidir à température ambiante. Une dernière ligation a lieu dans les mêmes conditions que la première, suivie de l'inactivation de la ligase. Le mélange est ensuite filtré par "Microcon 100" (4 passages de 400 µl de Tris-EDTA à 500g).

La solution est ensuite stockée dans du Tris-HCl. De l'ADN est perdu lors du filtrage ; la concentration finale dans le tube est estimée par spectroscopie optique à 3 nM. Cependant, il n'y a aucune garantie que tous les ADN λ aient réagit avec les oligos pour former des constructions compétentes.

9.5 Préparation des surfaces et des billes

Les étapes de préparation des surfaces sont décrites dans [119]. Les principes sont les suivants : on procède à une polymérisation aléatoire formant des chaînes linéaires composées d'acide maléique et d'acrylamide. La polymérisation est radicalaire et fait intervenir les doubles liaisons des molécules de départ. La surface est elle-même fonctionnalisée avec un silane présentant une double liaison : on obtient ainsi une surface fonctionnalisée avec des polymères hydrophiles contenant des groupements carboxyliques. On procède ensuite à une réaction standard de couplage entre ces acides et les groupements amines (par exemple le radical de la Lysine) d'une protéine. On peut donc obtenir une surface fonctionnalisée avec de la streptavidine ou un anticorps dirigé contre la digoxygénine.

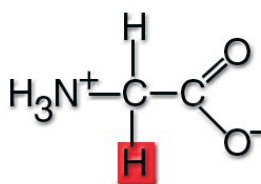
Les étapes de la préparation des billes sont les mêmes, mais elles sont effectuées de manière différentes pour certaines d'entre-elles. Pour la silanisation, on utilise une technique de sonication ; les rinçages s'effectuent en centrifugeant à plusieurs reprises la solution de billes en augmentant chaque fois le volume avec le tampon désiré. Le protocole d'activation des groupements carboxyl utilisé pour les surfaces ne convient pas aux billes car le temps de vie court de l'état activé ne permet pas de rincer la solution de billes : l'activation est alors effectuée avec du glutaraldéhyde sur 24 heures à 37°C.

9.6 Rappels sur la structure des protéines

Les protéines sont constituées d'un enchaînement d'*acides aminés* (ou *résidus*). Ils en existent 20 différents. Les acides aminés se caractérisent par la présence d'un groupement carboxyl à une extrémité et celle d'un groupement amine à l'autre extrémité. Chaque acide aminé est différencié suivant son *radical*. La formule générale d'un acide aminé est donc -CO-CHR-NH- , R désignant le radical. Sur la figure 9.5 est représentée la glycine, dont le radical est simplement un atome d'hydrogène.

Les acides aminés s'assemblent en formant une *liaison peptidique* -CONH- : une réaction de polymérisation entre la partie acide et la partie amine de deux acides aminés. Sur la figure 9.6 est représentée la liaison peptidique entre deux acides aminés.

Les deux extrémités d'une protéine sont différenciables : l'une se termine par un groupe acide, et l'autre amine ; on les appelle pour cela respectivement *extrémité C-terminale* et *N-terminale*. On définit alors une orientation de la chaîne peptidique : le sens $\text{COOH} \rightarrow \text{NH}_2$ est



GLYCINE (Gly)

FIG. 9.5 – Formule de la Glycine.

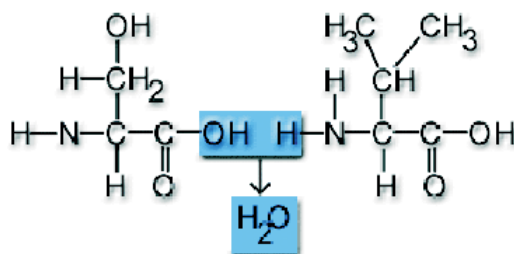


FIG. 9.6 – Formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés.

par convention le sens positif.

La séquence d'acides aminés d'une protéine constitue la *structure primaire* de la protéine. Les acides aminés peuvent interagir au niveau de la liaison peptidique en formant des liaisons hydrogène entre l'oxygène de l'extrémité acide et l'hydrogène du groupe amine. Ces interactions conduisent principalement à deux type de structures :

1. Les hélices α : elle est droite et compacte (elle ne permet pas l'intrusion d'une molécule étrangère sur son axe, même une molécule d'eau. Elles sont relativement courtes (12 acides aminés en moyenne). Le pas de l'hélice est de 0.54 nm.
2. Les feuillets β : ces structures s'établissent entre deux segments ou plus d'acides aminés. On distingue les feuillets parallèles et antiparallèles, suivant l'orientation des segments.

La formation de ces deux types d'arrangements ainsi que d'autres moins courants dépend de la séquence d'acides aminés, et sont stabilisés par des ponts hydrogène. Ils constituent la *structure secondaire* de la protéine. Les radicaux des acides aminés peuvent eux aussi interagir : la protéine prend alors une forme tridimensionnelle ; ces arrangements constituent la *structure tertiaire*. Enfin, les interactions entre les différentes unités de la protéine constituent la *structure quaternaire*, donnant la conformation définitive de la protéine.

Une augmentation de la température ou la présence d'un *agent dénaturant* (urée, chlorure de guanidinium) déstabilisent certaines liaisons des différents niveaux de structure et peuvent changer la conformation d'une protéine. De même la liaison avec un *ligand*, molécule de petite taille présentant une affinité particulière pour un site de la protéine, peut modifier sa structure

et son fonctionnement (c'est la base du principe d'*allostérie*). La structure d'une protéine est donc déterminée par sa séquence d'acides aminés, l'influence du solvant et l'association éventuels de cofacteurs.

9.7 Codes des acides aminés

A chaque acide aminé correspond deux codes : un code d'une lettre et un code de trois lettres, dont les correspondances sont indiquées dans le tableau suivant :

Symbole	Code 3c	Acide Aminé
A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide Aspartique
E	Glu	Acide Glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Serine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

Les acides aminés peuvent se classer suivant leur radical : il existe des résidus neutres, acides ou basiques ; on peut définir un niveau d'hydrophobie ou d'hydrophilie ; certains radicaux sont des cycles aromatiques (Tyr, Trp, Phe, His), etc...

9.8 Définitions des termes statistiques utilisés

On considère N mesures d'une quantité X . La moyenne de X est noté $\langle X \rangle$. On définit une première quantité, la variance Var par :

$$Var = \frac{1}{(N-1)} \sum_{i=1}^N (X_i - \langle X \rangle)^2$$

DS désigne la déviation standard, et ESM l'erreur standard sur la moyenne. Ces quantités sont définies par :

$$DS = \sqrt{Var}$$
$$ESM = \frac{DS}{\sqrt{N}}$$

Bibliographie

- [1] M. Delarue, O. Poch, N. Tordo, D. Moras, P. Argos, An attempt to unify the structure of polymerases, *Protein Eng.* **3** 461 (1990)
- [2] O.Poch, I. Sauvaget, M. Delarue, N. Tordo, Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements, *EMBO J.* **8** 3867 (1989)
- [3] J. Mendez, L. Blanco, J.M. Làzaro, M. Salas, Primer-terminus stabilization at the ϕ 29 DNA polymerase active site, *J. Biol. Chem.* **269** 30030 (1994)
- [4] L.Holm and C.Sanders, DNA polymerase β belongs to an ancient nucleotidyltransferase superfamily, *T.I.B.S.* **20** 345 (1995)
- [5] D.A. Erie, T.D. Yager, P.H. von Hippel, The single-nucleotide addition cycle in transcription : a Biophysical and Biochemical Perspective, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21** 379 (1992)
- [6] L.A. Kohlstaedt, J. Wang, J.M. Friedman, P.A. Rice, T.A. Steitz, Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with inhibitor, *Science* **256** 1783 (1992)
- [7] H. Huang, R. Chopra, G.L. Verdine, S.C. Harrison, Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptases : implications for drug resistance, *Science* **282** 1669 (1998)
- [8] A.C. Storer and A. Cornish-Bowden, Concentration of MgATP^{2-} and other ions in solution, *Biochem. J.* **159** 1 (1976)
- [9] C.T. Martin, D.K. Muller, J.E. Coleman, Processivity in early stages of transcription by T7 RNA polymerase, *Biochemistry* **27** 3966 (1988)
- [10] C. Liu, C.T. Martin, Promoter clearance by T7 RNA polymerase, *J. Biol. Chem.* **277** 2725 (2002)
- [11] J. Likke-Andersen and J. Christiansen, The C-terminal carboxy group of T7 RNA polymerase ensures efficient magnesium ion-dependent catalysis, *Nucl. Acids Res.* **26** 5630 (1998)
- [12] J. Monod, J. Wyman, J.-P. Changeux, On the nature of allosteric transition : a plausible model, *J. Mol. Biol.* **12** 88 (1965)
- [13] O.V. Makarova, E.M. Makarov, R. Sousa, M. Dreyfus, Transcribing of *Escherichia coli* genes with mutant T7 RNA polymerases : Stability of lacZ mRNA inversely correlates with polymerase speed, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92** 12250 (1995)

- [14] I. Iost, J. Guillerez, M. Dreyfus, Bacteriophage T7 RNA polymerase travels far ahead of ribosomes *in vivo*, *J. Bacteriol.* **174**, 619 (1992)
- [15] A-Young Moon Woody, P.A. Osumi-Davis, M.M. Hiremath, R.W. Woody, Pre-steady-state and steady-state kinetic studies on transcription initiation catalyzed by T7 RNA polymerase and its active-site mutants K631R and Y639F, *Biochemistry* **37** 15958 (1998)
- [16] A-Young Moon Woody, S.A. Eaton, P.A. Osumi-Davis, R.W. Woody, Asp537 and Asp812 in bacteriophage T7 RNA polymerase as metal Ion-Binding sites studied by EPR, Flow-dialysis, and Transcription, *Biochemistry* **35** 144 (1996)
- [17] S. Tabor and C.C. Richardson, A single residue in DNA polymerase of *Escherichia coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxyribonucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92** 6339 (1995)
- [18] D.T. Minnick, M. Astatke, C.M. Joyce, T.A. Kunkel, A thumb subdomain mutant of the large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I with reduced DNA binding affinity, processivity, and frameshift fidelity, *J. Biol. Chem.* **271** 24954 (1996)
- [19] K. Bebenek, W.A. Beard, J.R. Casa-finet, H.R. Kim, T.A. Darden, S.H. Wilson, T.A. Kunkel, Reduced frameshift fidelity and processivity of HIV-1 Reverse Transcriptase mutants containing alanine substitutions in helix H of the thumb subdomain, *J. Biol. Chem.* **270** 19516 (1995)
- [20] C.M. Joyce, Choosing the right sugar : How polymerases select a nucleotide substrate, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94** 1619 (1997)
- [21] M. Astatke, N.D.F. Grindley, C.M. Joyce, Deoxynucleoside triphosphate and pyrophosphate binding sites in the catalytically competent ternary complex for the polymerase reaction catalyzed by DNA polymerase I (Klenow fragment), *J. Biol. Chem.* **270** 1945 (1995)
- [22] J.B. Bell, K.A. Eckert, C.M. Joyce, T.A. Kunkel, Base miscoding and strand misalignment errors by mutator Klenow polymerases with amino acid substitutions at tyrosine 766 in the O helix of the fingers subdomain, *J. Biol. Chem.* **272** 7345 (1997)
- [23] G.Gao, M. Orlova, M.M. Georgiadis, W.A. Hendrikson, S.P. Goff, Conferring RNA polymerase activity to a DNA polymerase : a single residue in reverse transcriptase controls substrate selection, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94** 407 (1997)
- [24] J.R. Kiefer, C. Mao, J.C. Braman, L.S. Beese, Visualizing DNA replication in a catalytically active *Bacillus* DNA polymerase crystal, *Nature* **391** 304 (1998)
- [25] L.P. Gardner, K.A. Mookhtiar, J.E. Coleman, Initiation, Elongation, and Processivity of Carboxyl-terminal mutants of T7 RNA polymerase, *Biochemistry* **36** 2908 (1997)
- [26] R. Sousa, T7 RNA polymerase, *Uirusu* **51** 81 (2001)
- [27] R. Sousa, Y.J. Chung, J.P. Rose, B-C Wang, Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 Å resolution, *Nature* **364** 593 (1993)
- [28] R. Padilla and R. Sousa, A mutant T7 RNA polymerase as a DNA polymerase, *EMBO J.* **14** 4609 (1995)

- [29] J.H. Huang, L.G. Brieba, R. Sousa, Misincorporation by wild-type and mutant T7 RNA polymerases : Identification of interactions that reduce misincorporation rates by stabilizing the catalytically incompetent open conformation, *Biochemistry* **39** 11571 (2000)
- [30] L.G. Brieba, R. Sousa, Roles of Histidine 784 and Tyrosine 639 in ribose discrimination by T7 RNA polymerase, *Biochemistry* **39** 919 (2000)
- [31] G. Bonner, E.M. Lafer, R. Sousa, Characterization of a set of T7 RNA polymerase active site mutants, *J. Biol. Chem.* **269** 25120 (1994)
- [32] G. Bonner, E.M. Lafer, R. Sousa, The Thumb subdomain of T7 RNA polymerase functions to stabilize the ternary complex during processive transcription, *J. Biol. Chem.* **269** 25129 (1994)
- [33] L.G. Brieba, V. Gopal, R. Sousa, Scanning mutagenesis reveals roles for helix N of the bacteriophage T7 RNA polymerase thumb subdomain in transcription complex stability, pausing, and termination, *J. Biol. Chem.* **276** 10306 (2001)
- [34] V. Gopal, L.G. Brieba, R. Guajardo, W.T. McAllister, R. Sousa, Characterization of structural features important for T7 RNAP elongation complex stability reveals competing complex conformations and role for the non-template strand in RNA displacement, *J. Mol. Biol.* **290** 411 (1999)
- [35] L.G. Brieba and R. Sousa, T7 promoter release mediated by DNA scrunching, *EMBO J.* **20** 6826 (2001)
- [36] J. Huang and R. Sousa, T7 RNA polymerase elongation complex structure and movement, *J. Mol. Biol.* **303** 347 (2000)
- [37] J. Huang, F. Eckstein, R. Padilla, R. Sousa, Mechanism of Ribose 2'-Group discrimination by an RNA polymerase, *Biochemistry* **36** 8231 (1997)
- [38] J. Huang, J. Villemain, R. Padilla, R. Sousa, Mechanisms by which T7 lysozyme specifically regulates T7 RNA polymerase during different phases of transcription, *J. Mol. Biol.* **293** 457 (1999)
- [39] R. Sousa, Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases, *T.I.B.S.* **21** 186 (1996)
- [40] S. Mukherjee, L.G. Brieba, R. Sousa, Structural Transitions mediating transcription initiation by T7 RNA polymerase, *Cell* **110** 81 (2002)
- [41] R. Guajardo, P. Lopez, M. Dreyfus, R. Sousa, NTP concentration effects on initial transcription by T7 RNAP indicate that translocation occurs through passive sliding and reveal that divergent promoters have distinct NTP concentration requirements for productive initiation, *J. Mol. Biol.* **281** 777 (1998)
- [42] Y. Whitney Yin and T.A. Steitz, Structural basis for the transition from initiation to elongation transcription in T7 RNA polymerase, *Science* **298** 1387 (2002)
- [43] D. Jeruzalmi and T.A Steitz, Structure of T7 RNA polymerase complexed to transcriptional inhibitor T7 lysozyme, *EMBO J.* **17** 4101 (1998)

- [44] G.M.T. Cheetham, D. Jeruzalmi, T.A. Steitz, Structural basis for initiation of transcription from an RNA polymerase-promoter complex, *Nature* **399** 80 (1999)
- [45] G.M.T. Cheetham and T.A. Steitz, Structure of a transcribing T7 RNA polymerase initiation complex, *Science* **286** 2305 (1999)
- [46] C.A. Brautigam and T.A. Steitz, Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8** 54 (1998)
- [47] T.A. Steitz, DNA polymerases : structural diversity and common mechanisms, *J. Biol. Chem.* **274** 17395 (1999)
- [48] J. Wang, A.K.M.A Sattar, C.C. Wang, J.D. Karam, W.H. Konigsberg, T.A. Steitz, Crystal structure of a pol α family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69, *Cell* **89** 1087 (1997)
- [49] Y. Li, S. Korolev, G. Waksman , Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I : structural basis for nucleotide incorporation, *EMBO J.* **17** 7514 (1998)
- [50] S. Doublié, S. Tabor, A.M. Long, C.C. Richardson, T. Ellenberger, Crystal Structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution, *Nature* **391** 251 (1998)
- [51] S. Sastry and B.M. Ross, RNA-binding site in T7 RNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95** 9111 (1998)
- [52] S. Sastry and B.M. Ross, Nuclease activity of T7 RNA polymerase and the heterogeneity of transcription elongation complexes, *J. Biol. Chem.* **272** 8644 (1997)
- [53] D.G. Vassylyev, S.-I. Sekine, O. Laptenko, J. Lee, M.N. Vassylyeva, S. Borukhov, S. Yokoyama, Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution, *Nature* **417** 712 (2002)
- [54] P.E. Montesana, S.T. Chin-Bow, R. Sousa, W.T. McAllister, Characterization of halted T7 RNA polymerase elongation complexes reveals multiple factors that contribute to stability, *J. Mol. Biol.* **302** 1049 (2000)
- [55] D. Temiakov, P.E. Montesana, K. Ma, A. Mustaev, S. Borukhov, W.T. McAllister, The specificity loop of T7 RNA polymerase interacts first with the promoter and then with the elongating transcript, suggesting a mechanism for promoter clearance, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97** 14109 (2000)
- [56] D.L. Lyakhov, B. He, X. Zhang, F.W. Studier, J.J. Dunn, W.T. McAllister, Pausing and termination by bacteriophage T7 RNA polymerase, *J. Mol. Biol.* **280** 201 (1998)
- [57] D.L. Lyakhov, B. He, X. Zhang, F.W. Studier, J.J. Dunn, W.T. McAllister, Mutant bacteriophage T7 RNA polymerases with altered termination properties, *J. Mol. Biol.* **269** 28 (1997)
- [58] D. Imburgo, M. Anikin, W.T. McAllister, Effects of substitutions in a conserved DX₂GR sequence motif, found in many DNA-dependent nucleotide polymerases, on transcription by T7 RNA polymerase, *J. Mol. Biol.* **319** 37 (2002)

- [59] Kaiyu Ma, Dmitri Temiakov, Manli Jiang, Michael Anikin, William T. McAllister, Major conformation changes occur during the transition from an initiation complex to an elongation complex by T7 RNA polymerase, *J. Biol. Chem.* published August 16, 2002 as 10.1074/jbc.M206658200
- [60] T.H. Tahirov, D. Temiakov, M. Anikin, V. Patlan, W.T. McAllister, D.G. Vassylyev, S. Yokoyama, Structure of a T7 RNA polymerase elongation complex at 2.9 Å resolution, 9 octobre 2002 (doi :10.1038/nature01129)
- [61] M. Chamberlin and Ring, Characterization of T7-specific ribonucleic acid polymerase, *J. Biol. Chem.* **248** 2235 (1973)
- [62] M. Golomb and M. Chamberlin, Characterization of T7-specific ribonucleic acid polymerase, *J. Biol. Chem.* **249** 2858 (1974)
- [63] K.A. Mookhtiar, P.S. Peluso, D.K. Muller, J.J. Dunn, J.E. Coleman, Processivity of T7 RNA polymerase requires the C-terminal Phe882-Ala883-COO⁻ or "foot", *Biochemistry* **30** 6305 (1991)
- [64] M.D. Wang, M.J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, S.M. Block, Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase, *Science* **282** 902 (1998)
- [65] Y. Harada, O. Ohara, A. Takatsuki, H. Itoh, N. Shimamoto, K. Kinoshita Jr, Direct observation of DNA rotation during transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase, *Nature* **409** 113 (2001)
- [66] H. Yin, M.D. Wang, K. Svoboda, R. Landick, S.M. Block, J. Gelles, Transcription against an applied force, *Science* **270** 1653 (1995)
- [67] S.B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, Overstretching B-DNA : The elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecule, *Science* **271** 795 (1996)
- [68] K. Adelman, A. La Porta, T.J. Santangelo, J.T. Lis, J.W. Roberts, M.D. Wang, Single, molecule analysis of RNA polymerase elongation reveals uniform kinetic behavior, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99** 13538 (2002)
- [69] B. Maier, D. Bensimon, V. Croquette, Replication by a single DNA polymerase of a stretched single-stranded DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97** 12002 (2000)
- [70] C.G. Baumann, G.M. Skinner, J.E. Molloy, J.G. Hoggett, Observing promoter binding, initiation, elongation and template release by a single RNA polymerase molecule, *DNA in chromatin : at the frontiers of biology, biophysics and genomics*, Meeting d'Arcachon, 23-29 mars 2002.
- [71] Q. Xue and E.S. Yeung, Differences in the chemical reactivity of individual molecules of an enzyme, *Nature* **373** 681 (1995)
- [72] R.G. Cox, The motion of long slender bodies in a viscous fluid, *J. Fluid. Mech.* **44** 791 (1970)
- [73] K. Francis and B.O. Palsson, Effective intracellular communication distances are determined by relative time constants for cyto/chemokine secretion and diffusion, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94** 12258 (1997)

- [74] R. Guajardo and R. Sousa, A model for the Mechanism of Polymerase Translocation, *J. Mol. Biol.* **265** 8 (1997)
- [75] J.E. Foster, S.F. Holmes, D.A. Erie, Allosteric binding of nucleoside triphosphates to RNA polymerase regulates transcription elongation, *Cell* **106** 243 (2001)
- [76] J. Ninio, Alternative to the steady-state method : Derivation of reaction rates from first-passage times and pathway probabilities, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84** 663 (1987)
- [77] J. Ninio, Kinetic and probabilistic thinking in accuracy, *in* Accuracy in molecular processes, its control and relevance to living systems, Chapman and Hall 1986
- [78] M. Maslak and C.T. Martin, Effect of solution conditions on the steady-state kinetics of initiation of transcription by T7 RNA polymerase, *Biochemistry* **33** 6818 (1994)
- [79] S. Arnold, M. Siemann, K. Scharnweber, M. Werner, S. Baumann, M. Reuss, Kinetic Modeling and Simulation of *In Vitro* Transcription by Phage T7 RNA Polymerase, *Biotechnol. Bioeng.* **72** 548 (2001)
- [80] J.S. Young, W.F. Ramirez, R.H. Davis, Modeling and optimization of a batch process for *in vitro* RNA production, *Biotechnol. Bioeng.* **56** 210 (1997)
- [81] J.L. Oakley, R.E. Strothkamp, A.H. Sarris and J.E. Coleman, T7 RNA polymerase : Promoter structure and polymerase binding, *Biochemistry* **18** 528 (1979)
- [82] M.J. Hubley, B.R. Locke, T.S. Moerland, The effects of temperature, pH, and magnesium on the diffusion coefficient of ATP in solutions of physiological ionic strength, *Biochimica et Biophysica Acta* **1291** 115 (1996)
- [83] J. Pelmont, Enzymes, catalyseurs du monde vivant, Presses universitaires de Grenoble (1995)
- [84] T. Odijk, Stiff chains and filaments under tension, *Macromolecules* **28** 7016 (1995)
- [85] M.D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, S.M. Block, Stretching DNA with optical tweezers, *Biophys. J.* **72** 1335 (1997)
- [86] J.M.R. Parrondo and B.J. De Cisneros, Energetics of Brownian motors : a review, *Appl. Phys. A* **75** 179 (2002)
- [87] R.D. Astumian, Thermodynamics and kinetics of a Brownian Motor, *Science* **276** 917 (1997)
- [88] R.P. Feynman, R.B. Leighton, M. Sands, The Feynman Lectures on Physics, Addison-Wesley Publishing Company, 1977.
- [89] P. Dimroth, H. Wang, M. Grabe, G. Oster, Energy transduction in the sodium F-ATPase of *Propionigenium modestum*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96** 4924 (1999)
- [90] J. Gelles and R. Landick, RNA polymerase as a molecular motor, *Cell* **93** 13 (1998)
- [91] C. Bustamante, D. Keller and G. Oster, The physics of molecular motors, *Acc. Chem. Res.* **34** 412 (2001)
- [92] F. Jülicher, A. Adjari and J. Prost, Modeling molecular motors, *Rev. Mod. Phys.* **69** 1269 (1997)

- [93] D. Keller and C. Bustamante, The mechanochemistry of molecular motor, *Biophys. J.* **78** 541 (2000)
- [94] F. Jülicher and R. Bruinsma, Motion of RNA polymerase along DNA : A stochastic model, *Biophys. J.* **74** 1169 (1998)
- [95] R.J. Davenport, G.J.L. Wuite, R. Landick, C. Bustamante, Single-molecule study of pausing and arrest by *E. coli* RNA polymerase, *Science* **287** 2497 (2000)
- [96] G.J.L. Wuite, S.B. Smith, M. Young, D. Keller, C. Bustamante, Single-molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA polymerase, *Nature* **404** 103 (2000)
- [97] E.P. Sablin and R.J. Fletterick, Nucleotide switches in molecular motors : structural analysis of kinesins and myosins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11** 716 (2001)
- [98] R.D. Vale and R.A. Milligan, The way things move : looking under the hood of molecular motor protein, *Science* **288** 88 (2000)
- [99] D.E. Smith, S.J. Tans, S.B. Smith, S. Grimes, D.L. Anderson, C. Bustamante, The bacteriophage ϕ 29 portal motor can package DNA against a large internal force, *Nature* **413** 748-752 (2001)
- [100] K. Visscher, M.J. Schnitzer and S.M. Block, Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp, *Nature* **400** 184 (1999)
- [101] M.J. Schnitzer, K. Visscher and S.M. Block, Force production by single kinesin motors, *Nat. Cell Biol.* **2** 718-723 (2000)
- [102] J.E. Baker, C. Brosseau, P.B. Joel, D.W. Warshaw, The biochemical kinetics underlying actin movement generated by one and many skeletal myosin molecules, *Biophys J.* **82** 2134 (2002)
- [103] C.M. Coppin, D.W. Pierce, L. Hsu, R.D. Vale, The load dependance of kinesin's mechanical cycle, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94** 8539 (1997)
- [104] W. Junge, ATP synthase and other motor proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96** 4735 (1999)
- [105] R. Yasuda, H. Noji, M. Yoshida, K. Kinosita Jr, H. Itoh, Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase, *Nature* **410** 898-904 (2001)
- [106] A.E. Senior, S.N. Nadanaciva, J. Weber, The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase, *Biochimica et biophysica acta* **1553** 188 (2002)
- [107] X. Chen and H. Berg, Torque-speed relationship of the flagellar rotary motor of *Escherichia coli*, *Biophys. J.* **78** 1036 (2000)
- [108] M. Carrion-Vasquez, A.F. Auberhauser, T.E. Fisher, P.E. Marszalek, H. Li, J.M. Fernandez, Mechanical design of proteins studied by single-molecule force spectroscopy and protein engineering, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **74** 63 (2000)
- [109] M. Carrion-Vasquez, A.F. Auberhauser, S.B. Fowler, P.E. Marszalek, S.E. Broedel, J. Clarke, J.M. Fernandez, Mechanical and chemical unfolding of a single protein : A comparison, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96** 3694 (1999)

- [110] R.B. Best, B. Li, A. Steward, V. Daggett, J. Clarke, Can non-mechanical proteins withstand force? Stretching barnase by atomic force microscopy and molecular dynamics simulation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81** 2344 (2001)
- [111] M. Rief, J. Pascual, M. Saraste, H.E. Gaub, Single molecule force spectroscopy of spectrin repeats : low unfolding forces in helix bundles, *J. Mol. Biol.* **286** 553 (1999)
- [112] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J.M. Fernandez, H.E. Gaub, Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM, *Science* **276** 1109 (1997)
- [113] Handbook of chemistry and physics 1987-1988, 68th ed / editor in chief R.C. Weast.
- [114] A. Ashkin, Acceleration and trapping of particules by radiation pressure, *Phys. Rev. Lett.* **24**, 156-159 (1970)
- [115] A. Ashkin, Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime, *Biophys. J.* **61**, 569-582 (1992)
- [116] K. Svoboda and S.M. Block, Biological applications of optical forces, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struc.* **23**, 247 (1994)
- [117] S.P. Smith, S.R. Bhalotra, A.L. Brody, B.L. Brown, E.K. Boyda and M. Prentiss, Inexpensive optical tweezers for undergraduate laboratories, *Am. J. Phys.* **67**, 26 (1999)
- [118] F. Gittes and C.F. Schmidt, Signal and noise in micromechanical measurements, *Methods in cell Biology* **55**, 129 (1998)
- [119] U. Bockelmann, Ph. Thomen, B. Essevaz-Roulet, V. Viasnoff, F. Heslot, Unzipping DNA with optical tweezers : high sequence sensitivity and force flips, *Biophys. J.* **82** 1537 (2002)
- [120] S.J. Koch, A. Shundrovsky, B.C. Jantzen, M.D. Wang, Probing protein-DNA interactions by unzipping a single DNA double helix, *Biophys J.* **83** 1098 (2002)
- [121] H.-J. Ehbrecht, A. Pingoud, C. Urbanke, G. Maass, C. Gualerzi, Linear diffusion of restriction endonucleases on DNA, *J. Biol. Chem.* **260** 6160 (1985)
- [122] N.C. Horton and J.J. Perona, Recognition of flanking DNA sequences by *EcoR* V endonuclease involves alternative patterns of water-mediated contacts, *J. Biol. Chem.* **273** 21721 (1998)
- [123] N.C. Horton and J.J. Perona, Crystallographic snapshots along a protein-induced DNA-bending pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97** 5729 (2000)
- [124] N.P. Stanford, M.D. Szczelkun, J.F. Marko, S.E. Halford, One- and three-dimensional pathway for proteins to reach specific DNA sites, *EMBO J.* **19** 6546 (2000)
- [125] S.E. Halford, Hopping, jumping and looping by restriction enzymes, *Biochem. Soc.* **29** 363 (2001)
- [126] N. Shimamoto, One-dimensional diffusion of proteins along DNA, *J. Biol. Chem.* **274** 15293 (2000)
- [127] I.B. Vipond and S.E. Halford, Specific DNA recognition by *EcoR* V induced by Calcium ions, *Biochemistry* **34** 1113 (1995)

- [128] A. Jeltsch, C. Wenz, F. Stahl, A. Pingoud, Linear diffusion of the restriction endonuclease *EcoR* V on DNA is essential for the *in vivo* function of the enzyme, *EMBO J.* **15** 5104 (1995)
- [129] A. Jeltsch and A. Pingoud, Structure and function of type II restriction endonucleases, *Nucl. Acids Res.* **29** 3705 (2001)
- [130] S.L. Reid, D. Parry, H.-H. Liu, B.A. Connolly, Binding and recognition of GATATC target sequences by the *EcoR* V restriction endonuclease : A study using fluorescent oligonucleotides and fluorescence polarization, *Biochemistry* **40** 2484 (2001)
- [131] L.E. Engler, P. Sapienza, L.F. Dorner, R. Kucera, I. Schildkraut, L. Jen-Jacobson, The energetics of the interaction of *Bam*H I endonuclease with its recognition site GGATCC, *J. Mol. Biol.* **307** 619 (2001)
- [132] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, 1994, The molecular Biology of the Cell (Garland, New York)
- [133] E. Evans and K. Ritchie, Dynamic strength of molecular adhesion bonds, *Biophys. J.* **72** 1541 (1997)
- [134] R.Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, E. Evans, Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy, *Nature* **397** 50 (1999)
- [135] A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox, Principles of Biochemistry, second edition, Worth Publishers 1993
- [136] R.M.A. Azzam and N.M. Bashara, Ellipsometry and polarized light, North-Holland Personal Library 1989
- [137] C. Levinthal and H. Crane, On the unwinding of DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **42**, 436 (1956)
- [138] C.H. Lee and J.G. Wetmur, Kinetics of helix formation between complementary ribohomopolymers and deoxyribohomopolymers, *Biopolymers* **11**, 1485 (1972)
- [139] P. Nelson, Transport of torsional stress in DNA *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 14342 (1999)
- [140] (a) B. Essevaz-Roulet, U. Bockelmann and F. Heslot, Mechanical separation of the complementary strands of DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 11935 (1997)
 (b) U. Bockelmann, B. Essevaz-Roulet and F. Heslot, Molecular stick-slip motion revealed by opening DNA with piconewton forces, *Phys. Rev. Lett.* **79**, 4489 (1997)
 (c) U. Bockelmann, B. Essevaz-Roulet and F. Heslot, DNA strand separation studied by single molecule force measurements, *Phys. Rev. E* **58**, 2386 (1998)
- [141] J.F. Léger, G. Romano, A. Sarkar, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay, and J.F. Marko, Structural transitions of twisted and stretched DNA molecule, *Phys. Rev. Lett.* **83** 1066-1069 (1999)
- [142] B.S. Fujimoto, J.M. Miller, N.S. Ribeiro and J.M. Schurr, Effect of different cations on the hydrodynamic radius of DNA, *Biophys. J.* **67**, 304 (1994)

- [143] J.C. Meiners and S. Quake, Femtonewton force spectroscopy of single extended DNA molecule, *Phys. Rev. Lett.* **84** 5014 (2000)
- [144] Lamb, H. (1945) *Hydrodynamics* (Dover, New York), 6th Ed.
- [145] T.R. Strick, D. Bensimon, V. Croquette, Micro-mechanical measurement of the torsional modulus of DNA, *Genetica* **106**, 57 (1999)
- [146] T.T. Perkins, DE. Smith, R.G. Larson and S. Chu, Stretching of a single tethered polymer in a uniform flow, *Science* **268**, 83 (1995).
- [147] (a) B.H. Zimm, Extension in flow of a DNA molecule tethered at one end, *Macromolecules* **31**, 6089 (1998) (b) J.F. Marko and E.D. Siggia, Stretching DNA, *Macromolecules* **28** 8759 (1995)

Nous avons réalisé une expérience à l'échelle de la molécule unique pour étudier l'influence d'une force mécanique sur la transcription par l'ARN polymérase du phage T7. Cette enzyme, prototype de moteur moléculaire, est très processive et partage des homologies avec les membres de la famille Pol I incluant la transcriptase inverse du VIH 1. Une extrémité de l'ADN à transcrire est tenue par une polymérase fixée sur une surface, l'autre extrémité est attachée à une bille microscopique capturée à l'aide d'un piège optique interférométrique qui permet de mesurer la force développée durant la transcription. Des mesures de vitesse de transcription ont été réalisées dans la gamme 5-20 pN, à différentes concentrations en nucléotides (NTP). On observe que la diminution de la concentration en NTP, qui rend l'étape de liaison du nucléotide dans le site actif limitante, fait apparaître une dépendance marquée de la vitesse à la force, alors que les hautes concentrations en NTP rendent la polymérase insensible à la force. On en déduit que le mouvement d'avancée de l'enzyme le long de l'ADN est couplé à la fixation du nucléotide dans le site actif. Ainsi l'énergie d'hydrolyse n'est pas directement convertie en énergie mécanique. Les homologies entre polymérases suggèrent que ce mécanisme est également partagé, ce qui permet de proposer que pour les polymérases en général, l'étape de fixation du nucléotide dans le site actif est couplé au mouvement sur l'ADN.

Nous avons également mené un autre type d'expérience en mesurant la force lors de l'ouverture mécanique de la double hélice d'ADN, qui a permis de déterminer la friction exercée sur l'ADN en rotation.

La configuration d'ouverture de l'ADN a été également utilisée pour étudier l'interaction d'une protéine, *EcoR V* avec l'ADN. L'analyse des résultats a mis en évidence une grande variabilité dans l'énergie de dissociation, liée à des différences d'affinités entre les sites de reconnaissance spécifiques de l'enzyme.

Mot clés : ADN, transcription, ARN polymérase de T7, molécule unique, moteur moléculaire, ouverture, piège optique, friction, rotation, *EcoR V*.

We have performed single molecule experiments to measure the influence of mechanical force on a transcribing T7 RNA polymerase. This motor enzyme is highly processive, and structurally very related to Pol-I family including HIV 1 reverse transcriptase. One end of the template DNA is held by a polymerase anchored to a surface, the other end is attached to a microscopic bead which is captured by an optical trap that measures the force developed during transcription. We report velocity measurements performed with an applied force in the range 5-20 pN, and at different nucleotide concentrations. The nucleotide binding step in the catalytic cycle is limiting when lowering NTP concentration. We observe at low NTP concentration that the velocity of the enzyme becomes markedly force-dependent, whereas it is not at saturant NTP concentration. We deduce that the forward motion of the polymerase along DNA occurs upon nucleotide binding in the beginning of the reactions cycle. The energy of NTP hydrolysis is thus not directly used as mechanical energy. Homologies among polymerases suggest that translocation mechanism is also shared. Thus we propose that for polymerases in general, nucleotide binding is associated to forward motion.

We performed another type of single molecule experiment by measuring the force during the mechanical opening of DNA. It allowed us to determine the rotational drag undergone by a rotating DNA molecule.

This DNA unzipping configuration has also been used to study the interaction between *EcoR V* protein and DNA. The dissociation energy shows a large variability linked to different affinities of the target sites of the enzyme.

Key words : DNA, transcription, T7 RNA polymerase, single molecule, unzipping, optical tweezers, rotational drag, *EcoR V*.